



**Лаборатория ферментов репарации (д.х.н., профессор  
Г.А. Невинский)**

## **Основные функции селезёнки:**

**высвобожд** Лимфатические узлы

Это многочисленные органы иммунной системы. У взрослого человека их около пятисот. Они расположены по пути тока лимфы. Это такие образования круглой или овальной формы, размер которых от 2 до 20 мм. Находятся они в местах слияния лимфатических сосудов — под мышками, в паху, в шее, в области таза.

## **Лимфатические узлы**

Это многочисленные органы иммунной системы. У взрослого человека их около пятисот. Они расположены по пути тока лимфы. Это такие образования круглой или овальной формы, размер которых от 2 до 20 мм. Находятся они в местах слияния лимфатических сосудов — под мышками, в паху, в шее, в области таза.

Лимфатический узел состоит из соединительнотканной капсулы и лимфоидной ткани. Он служит барьером для распространения инфекции и раковых клеток по организму. В лимфатическом узле образуются лимфоциты, которые активно участвуют в уничтожении чужеродных веществ и клеток.

**Основные функции лимфатических узлов:** задержка бактерий и вирусов по пути тока лимфы; кроветворная функция.

## **Пейеровы бляшки**

Это узелковые скопления овальной или круглой формы, которые находятся в лимфоидной ткани. Располагаются они в слизистой оболочке тонкой кишки. Их диаметр — от 0,5 до 3 мм.

**Основные функции пейеровых бляшек:**

участие в процессе созревания Т- и В-лимфоцитов;  
формирование иммунного ответа организма.

**Фундаментальным и наиболее исследованным свойством иммуноглобулинов является их способность связывать и нейтрализовать самые разнообразные по структуре соединения – антигены.**

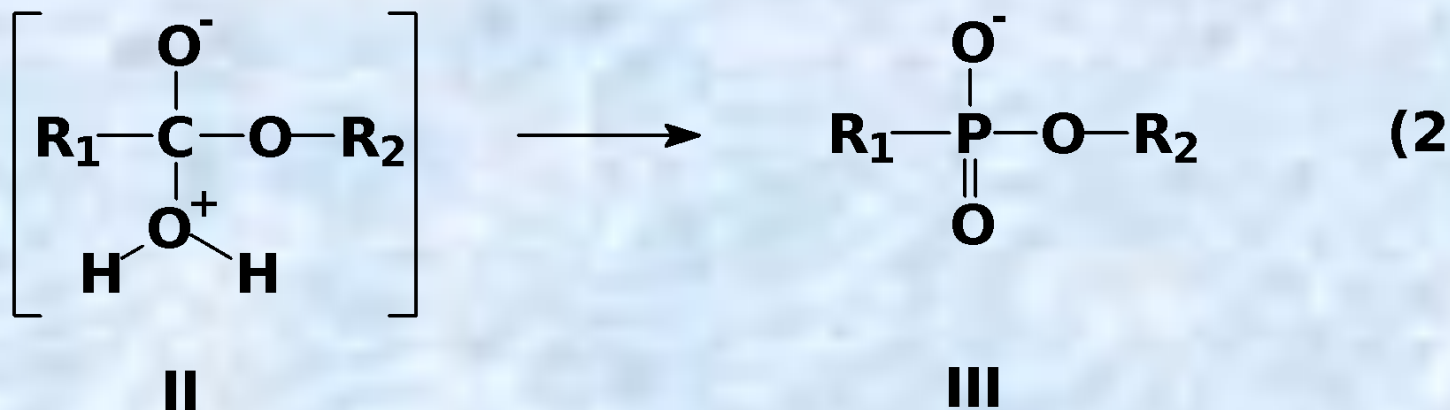
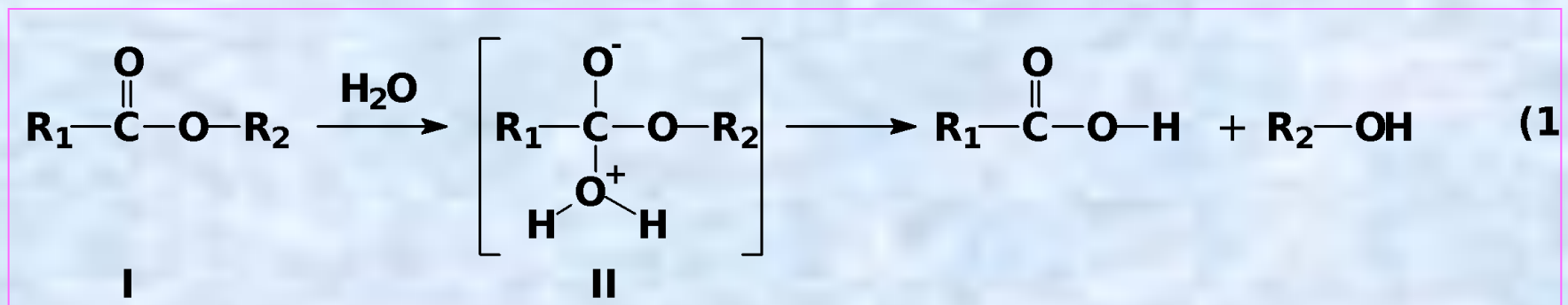
**Однако за последние два десятилетия открыты первые природные антитела с каталитической активностью, катализирующие самые разные химические реакции**

**Антитела-ферменты (AntiBody - enzyme) получили название “абзимы” (ABZYME)**

**Такие антитела появляются в биологических жидкостях больных различными аутоиммунными заболеваниями**

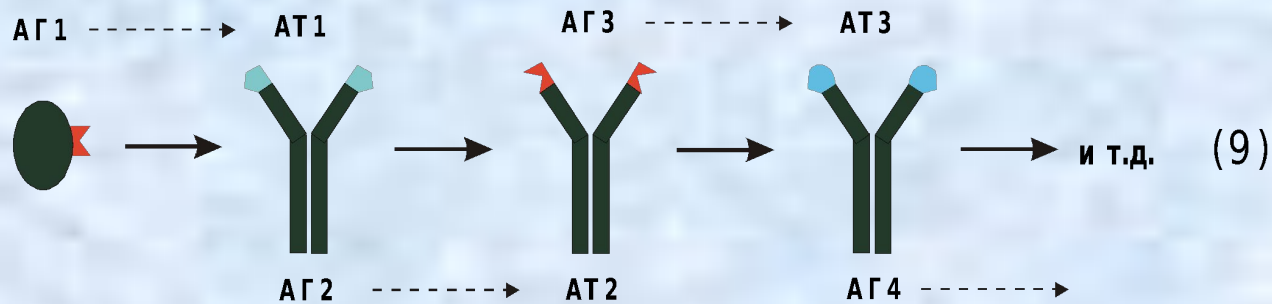
В настоящее время показано существование двух путей наработки антител ферментов.

**Первый путь** – наработка антител к молекулам, моделирующим переходные состояния химических реакций



*переходное состояние      аналог переходного состояния*

Еще одним путем генерации индуцированных абзимов является аутоиммунизация организма различными ферментами и наработка антител против активных центров ферментов.



Активный центр фермента в этом случае играет роль первого антигена (**АГ1**), на который вырабатываются первые идиотипические **АТ1**, которые являются слепком с активного центра фермента. **АТ1** в свою очередь также являются антигеном, на который вырабатываются вторичные –антиидиотипические **АТ2**, которые содержат элементы, соответствующие внутреннему образу активного центра фермента и могут обладать каталитической активностью. Согласно сети Эрне могут быть вплоть до нескольких этапов наработки антител – экспериментально показано формирование **АТ4**

**К настоящему моменту открыты природные абзимы, гидролизующие:**

- 1. Белки**
- 2. ДНК**
- 3. РНК**
- 4. Полисахариды**
- 5. Нуклеотиды (АТФ и т.д.)**

**ФОСФОРИЛИРУЮЩИЕ:**

- 1. Белки**
- 2. Липиды**
- 3. Полисахариды**

**С функциями фермента пероксидаз и оксидоредуктаз**

К настоящему моменту показано, что ДНК-гидролизующие абзимы отсутствуют у здоровых доноров, но есть в крови пациентов с :

**1. Системная красная волчанка**

**2. Рассеянный склероз**

**3. Полиартрит и полимиозит**

**4. Аутоиммунный тиреоидит (Тиреоредит Хашимото)**

**5. ВИЧ-инфекция**

**6. Клещевой энцефалит**

**7. Вирусный гепатит**

**8. Шизофрения**

**9. Сахарный диабет**

**10. Кровь и молоко лактирующих женщин**

**Отнесение каталитической активности непосредственно к абзимам требует проверки большого числа жёстких критериев**

**Основные критерии: а) АТ должны быть электрофоретически гомогенными при нанесении на дорожку геля 10-15 мкг и последующей окраске геля серебром;**

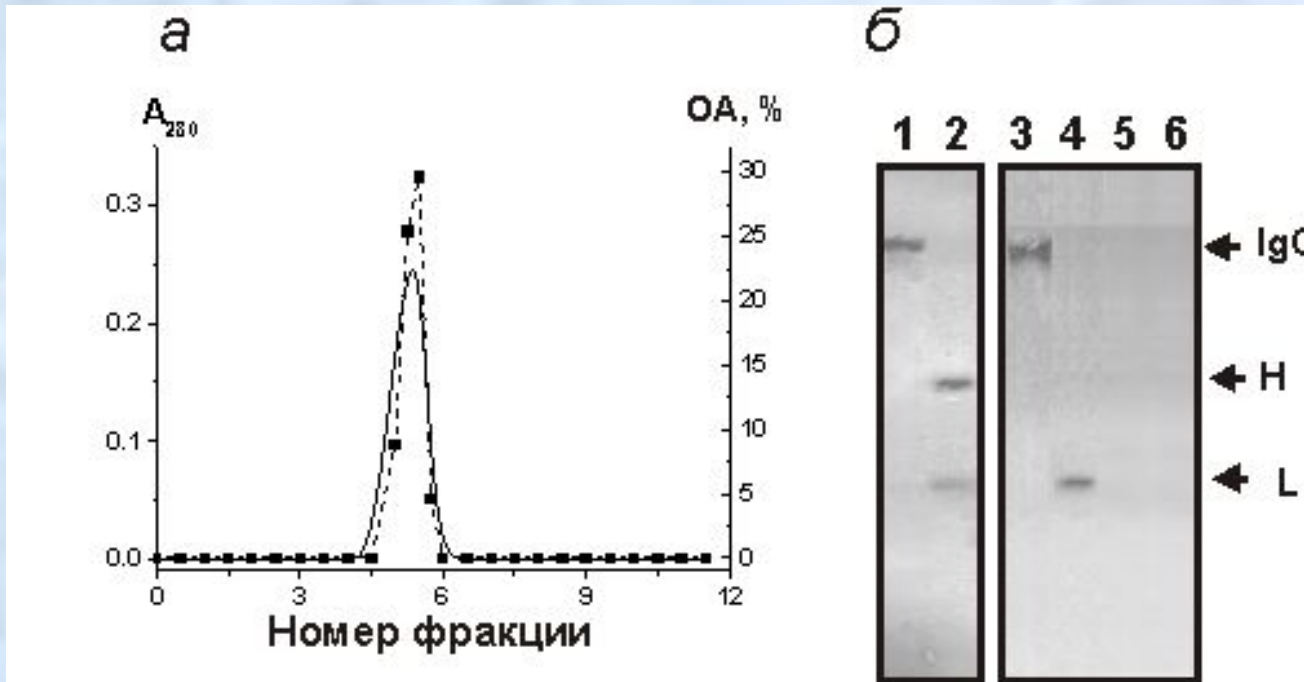
**б) гель-фильтрация АТ в условиях диссоциации сильных нековалентных комплексов в кислом буфере (рН 2,6) не должна приводить к исчезновению активности и положение пика активности должно совпадать с таковым для интактных антител**

**в) при нанесении АТ на колонки с сорбентами, содержащими иммобилизованные антитела животных против человеческих антител, в элюате не должно быть активности; пик ферментативной активности при специфической элюции АТ с сорбента кислым буфером должен совпадать с пиком антител;**

**г) каталитической активностью должны обладать F(ab) и F(ab)<sub>2</sub> фрагменты АТ; д) сродство антигенов-субстратов к абзимам должно быть выше, чем к каноническим ферментам.**

**д) После SDS-PAGE положение пика активности должно совпадать с положением белковой полосы антител**





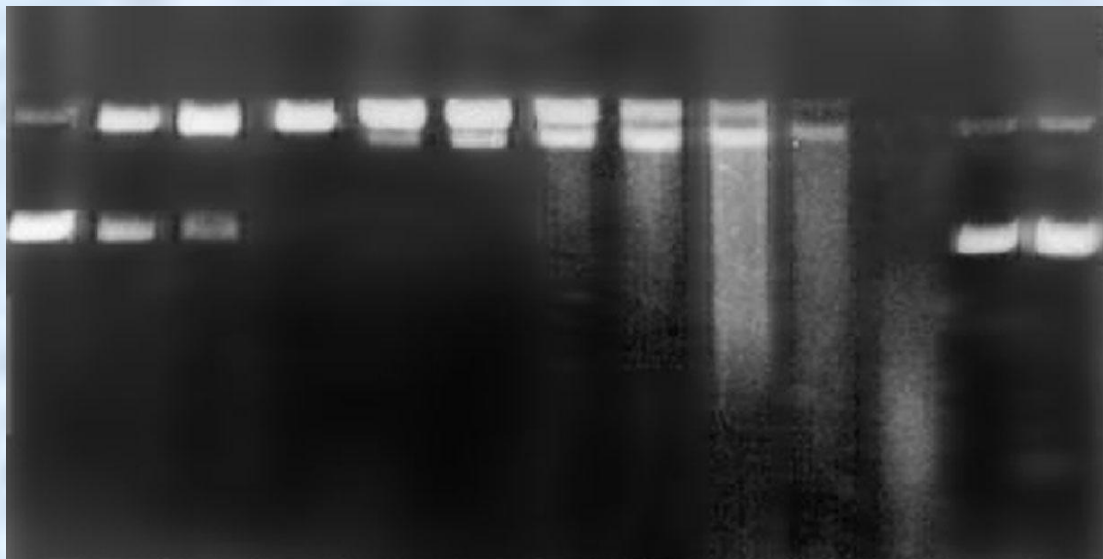
После гель-фильтрации АТ в условиях диссоциации сильных нековалентных комплексов в кислом буфере (рН 2,6) положение пика активности совпадает с таковым для интактных антител

После анализа *in situ* - SDS-PAGE с использованием геля содержащего полимерную ДНК (или РНК) участок геля не содержащий ДНК, в результате ее гидролиза, совпадает с положением интактных антител и их легких цепей.

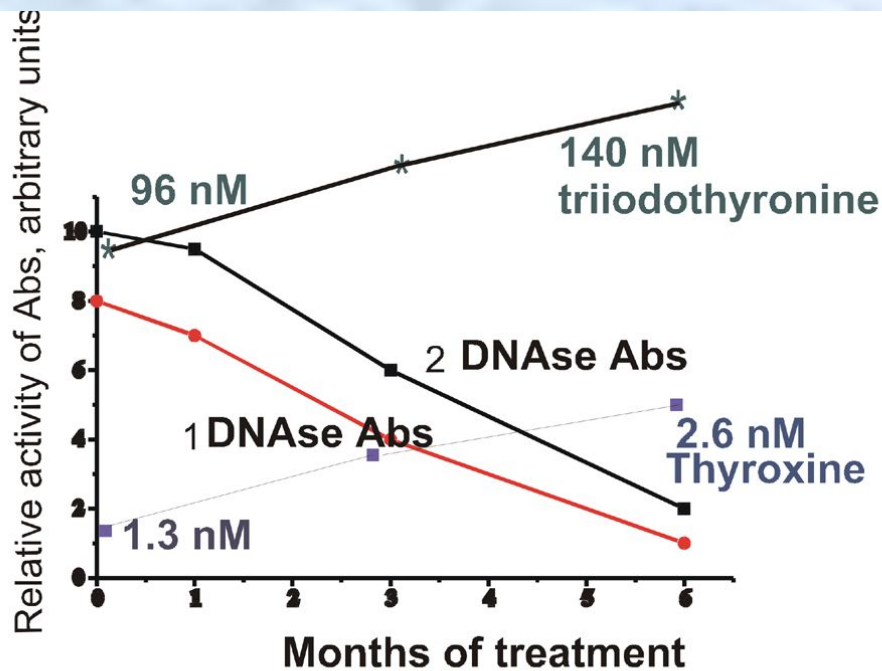
**Относительная активность ДНК-гидролизующих антител очень сильно зависит от пациента**

**Относительная активность антител 10 пациентов**

**K<sub>1</sub> 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 K<sub>2</sub> K<sub>3</sub>**



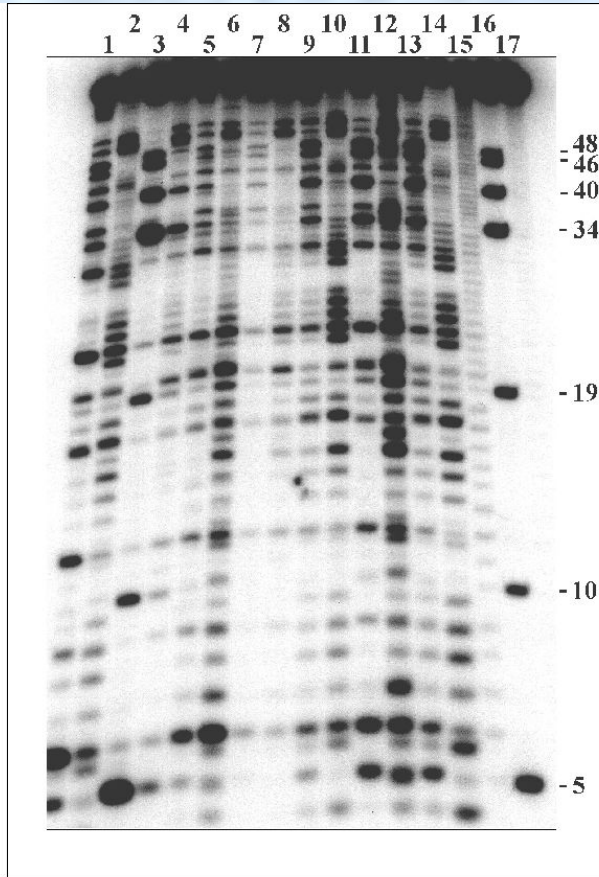
**Показано, что анализ относительной активности антител в гидролизе ДНК может быть использован для оценки глубины аутоиммунных реакций при аутоиммунных заболеваниях**



## Эффект лечения больных аутоиммунным тиреоидитом плаквинилом

Падение активности ДНК-гидролизующих антител и нормализация концентрации гормонов при лечении больных аутоиммунным тиреоидитом иммунокорректирующим препаратом плаквинилом сопряжено с нормализацией остальных биохимических и иммунологических индексов заболевания

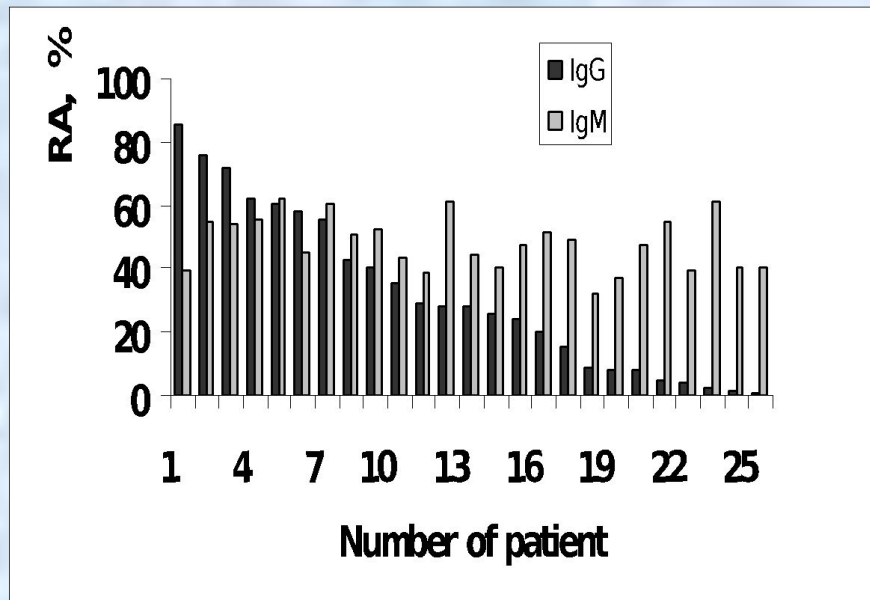
**Относительная активность и субстратная специфичность РНК-гидролизующих антител очень сильно зависит от типа аутоиммунного заболевания**



**Гидролиз тРНК антителами  
Из крови пациентов с  
Разными заболеваниями  
происходит по разным  
сайтам**

**ВАРИАЦИИ субстратной специфичности антител из крови  
больных различными аутоиммунными заболеваниями и молока  
лактующих женщин (гидролиз тРНК<sup>Phe</sup>)**

**Впервые показано, что абзимы крови больных рассеянным склерозом специфично гидролизуют основной белок миелина – белково-липидной оболочки аксонов, такие активности появляются на ранних стадиях заболевания и анализ их активности может быть использован для диагностики заболевания.**



**Активность IgG антител существенно ниже, чем IgM абзимов; у здоровых доноров такой активности иммуноглобулинов нет**

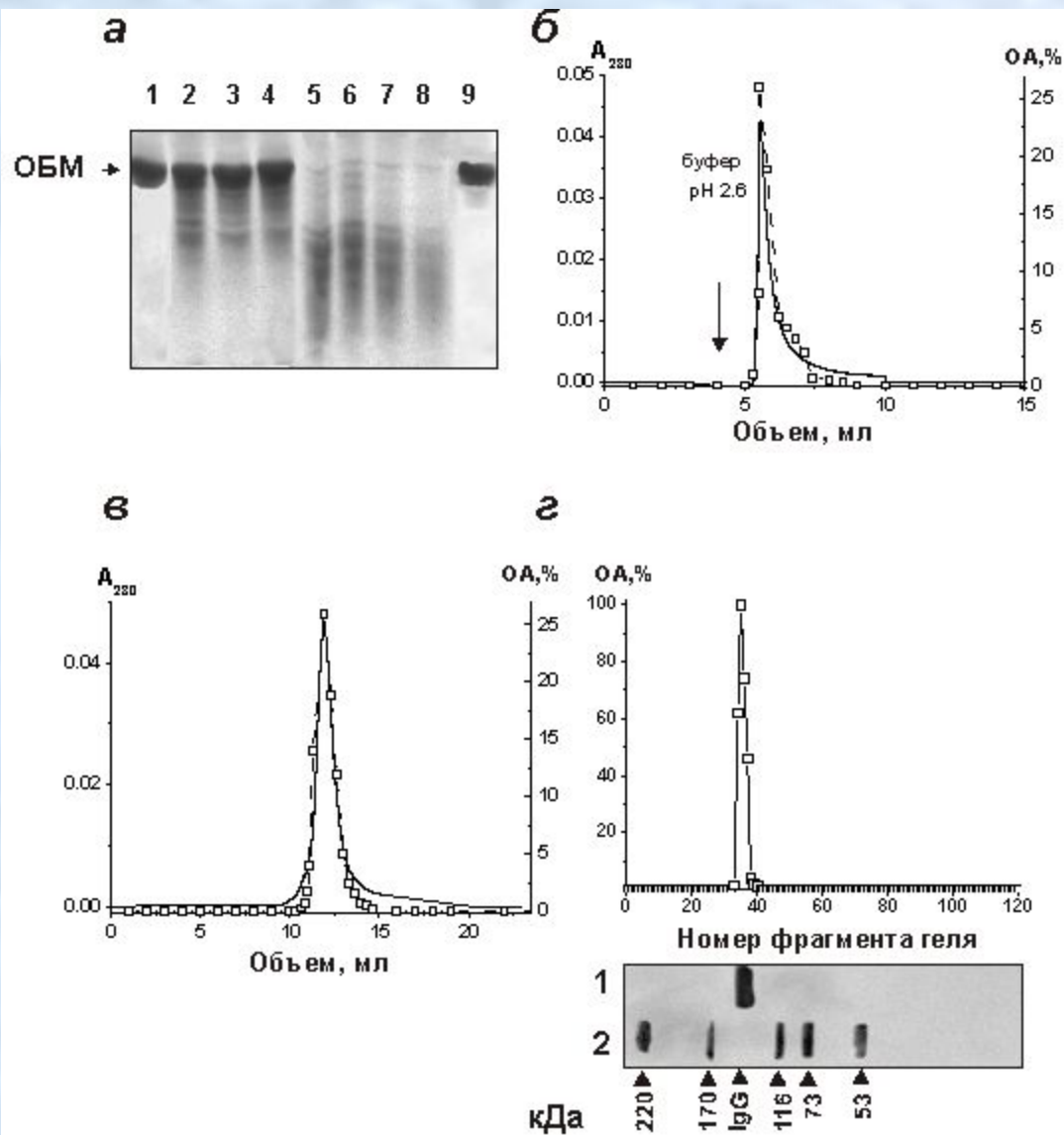
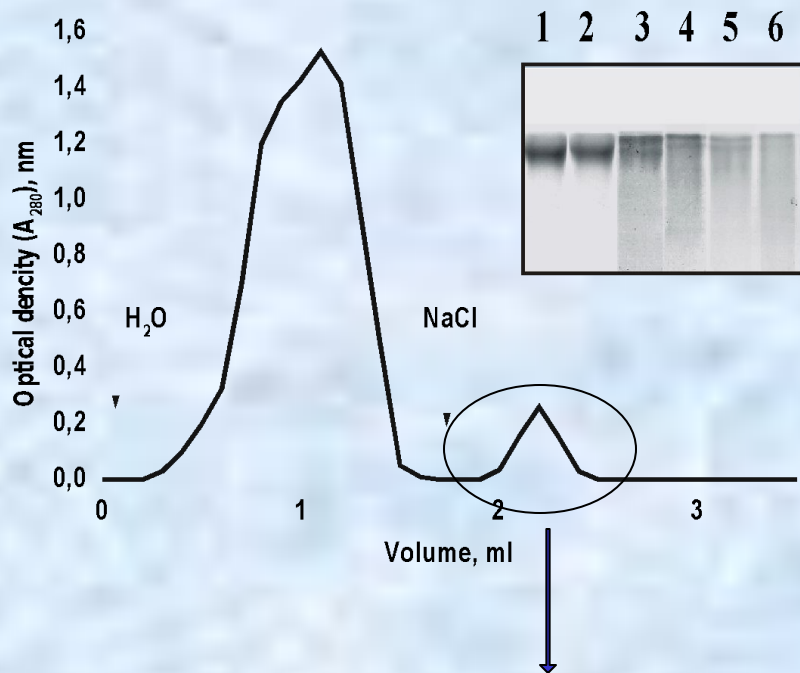


Рис. 2

- а) Гидролиз ОБМ**
- б) Адсорбция АТ человека антителами мышей против IgG и элюция кислым буфером**
- в) Совпадение положения пиков IgG и активности при гель-фильтрации в кислом буфере**
- г) Совпадение положения пиков IgG и активности После SDS-PAGE**

**На примере антител, гидролизующих основной белок миелина, нами впервые показано, что антитела с протеолитической активностью могут быть металло-протеазами**



**Небольшая фракция антител имеет сродство к сорбенту Chelex, связывающему металлы. Эта фракция антител гидролизует основной белок миелина только в присутствии ионов металлов:**

**Дорожка 1 – hMBP инкубированный без АТ, дорожки 2 – 6 в присутствии IgG: 2 – без  $Me^{2+}$  ионов, 3 – 5 мМ  $CaCl_2$  4 – 5 мМ  $CuCl_2$ , 5 – 5 мМ  $MnCl_2$  6 – 5 мМ  $MgCl_2$ .**

**Металло-протеаза**

**Зависимые и независимые от ионов металлов антитела, гидролизующие основной белок миелина обнаружены в крови пациентов с:**

**1.Рассеянный склероз**

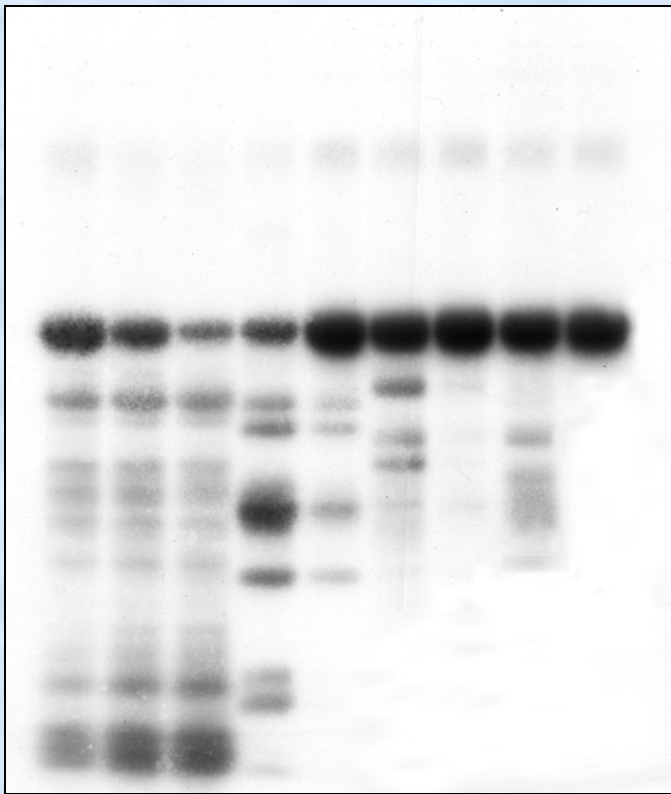
**2.Системная красная волчанка**

**3.Шизофрения**



В крови больных ВИЧ-инфицированных больных кроме ДНК-. РНК- гидролизующих, обнаружены антитела гидролизующие вирусные обратную транскриптазу и интегразу, а также казеин человека

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Анализ продуктов гидролиза антителами и классическими протеазами обратной транскриптазы

Дорожки 1-3 - антитела;

4, 5 –трипсин;

6, 7 – протеиназа К;

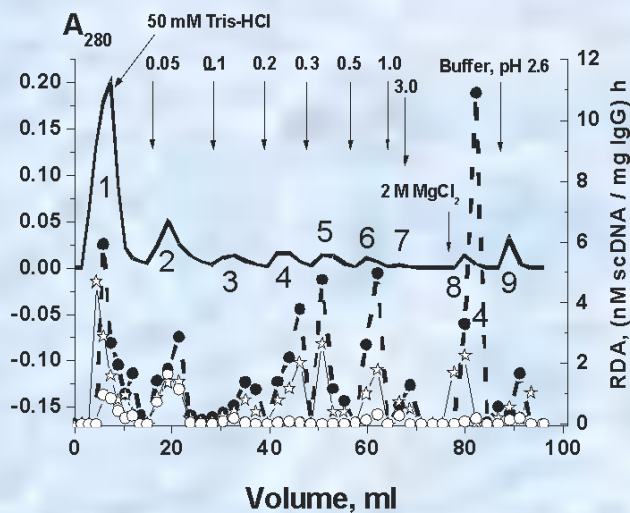
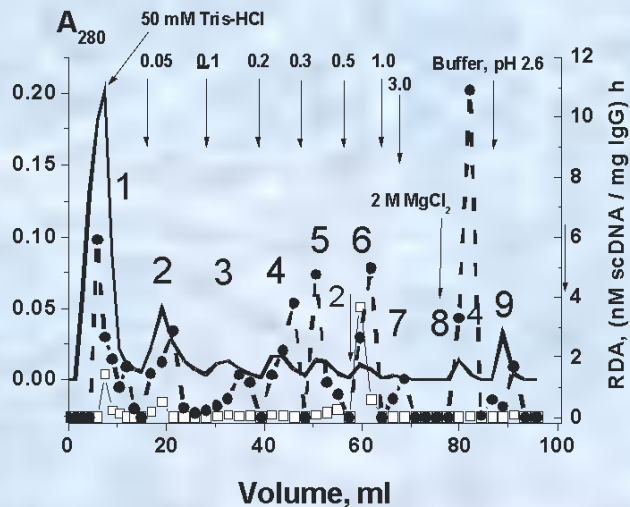
8 – химотрипсин;

9 –контроль без протеазы.

Продукты расщепления антителами и протеазами существенно различаются

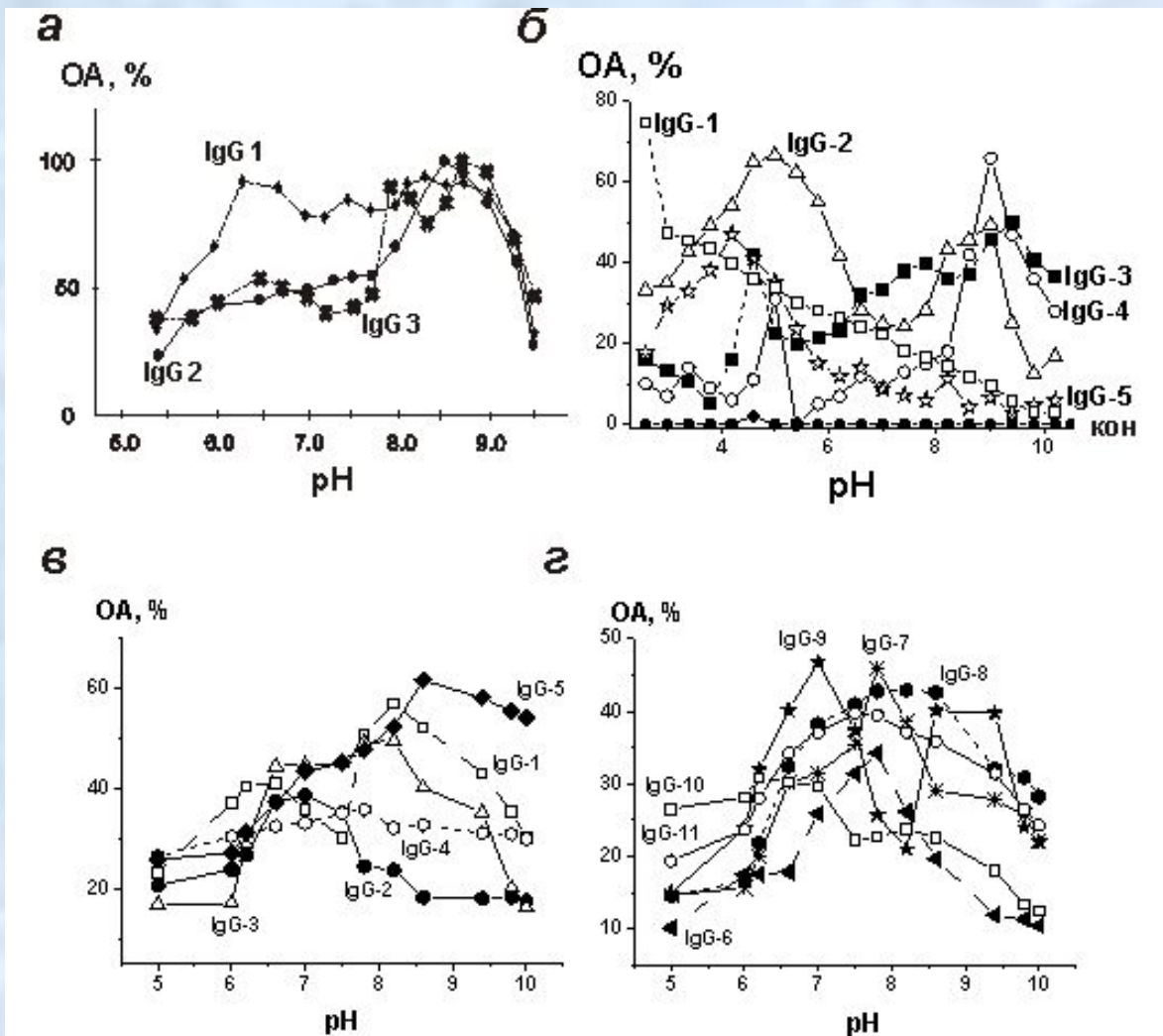
**Как указывалось ранее, теоретически количество антител против одного антигена может быть очень большим – до одного миллиона. Реально их образуется в организме человека намного меньше, но все равно много.**

**У больных АИЗ может формироваться в зависимости от индивида и его заболевания относительно узкий или достаточно обширный набор моноклональных ДНК-, РНК- и белок- и других гидролизующих абзимов в составе поликлональных IgG, IgA и IgM, которые исключительно гетерогенны и могут содержать легкие цепи как k-, так l-типа, быть антителами разных классов и подклассов, проявлять максимальную активность при различных значениях рН, иметь различные суммарные заряды, характеризоваться разным сродством к ДНК, РНК и белкам, проявлять различную зависимость активности от ионов одно- и двухвалентных металлов, самое разное сродство к антигенам-субстратам, а абзимы с протеолитической активностью могут быть протеазами четырех разных типов – сериновыми, тиоловыми, кислыми и металло-протеазами.**



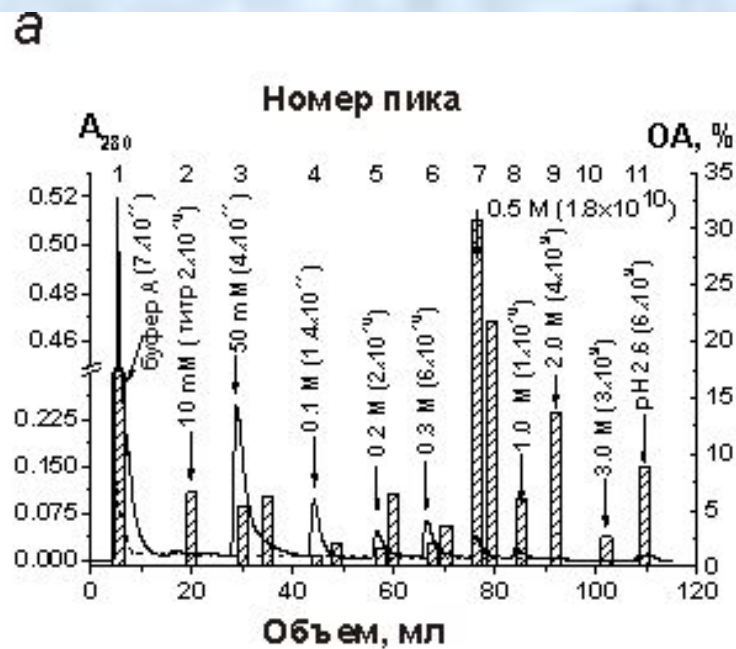
**Одним из путей разделения разных абзимов является аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными субстратами.**

**Например, аффинная хроматография антител на ДНК-целлюлозе приводит к разделению IgG с ДНКазной активностью на очень большое число подфракций. Эти подфракции демонстрируют различное сродство к ДНК и различные уровни относительной активности в присутствии и отсутствии ионов разных металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ ).**



**Множество разных рН оптимумов в гидролизе ДНК антителами из крови разных больных СКВ**

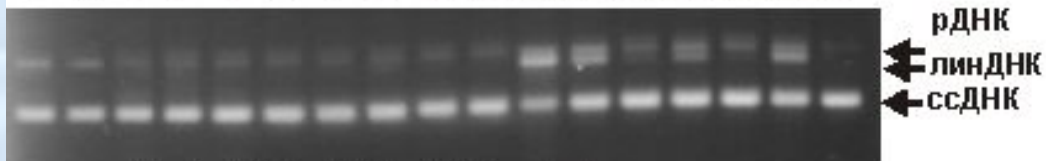
**Такое же множество разных рН оптимумов наблюдается в гидролизе антителами из крови разных больных РНК, белков, полисахаридов Нуклеотидов и т. д.**



**б**

Номер фракции

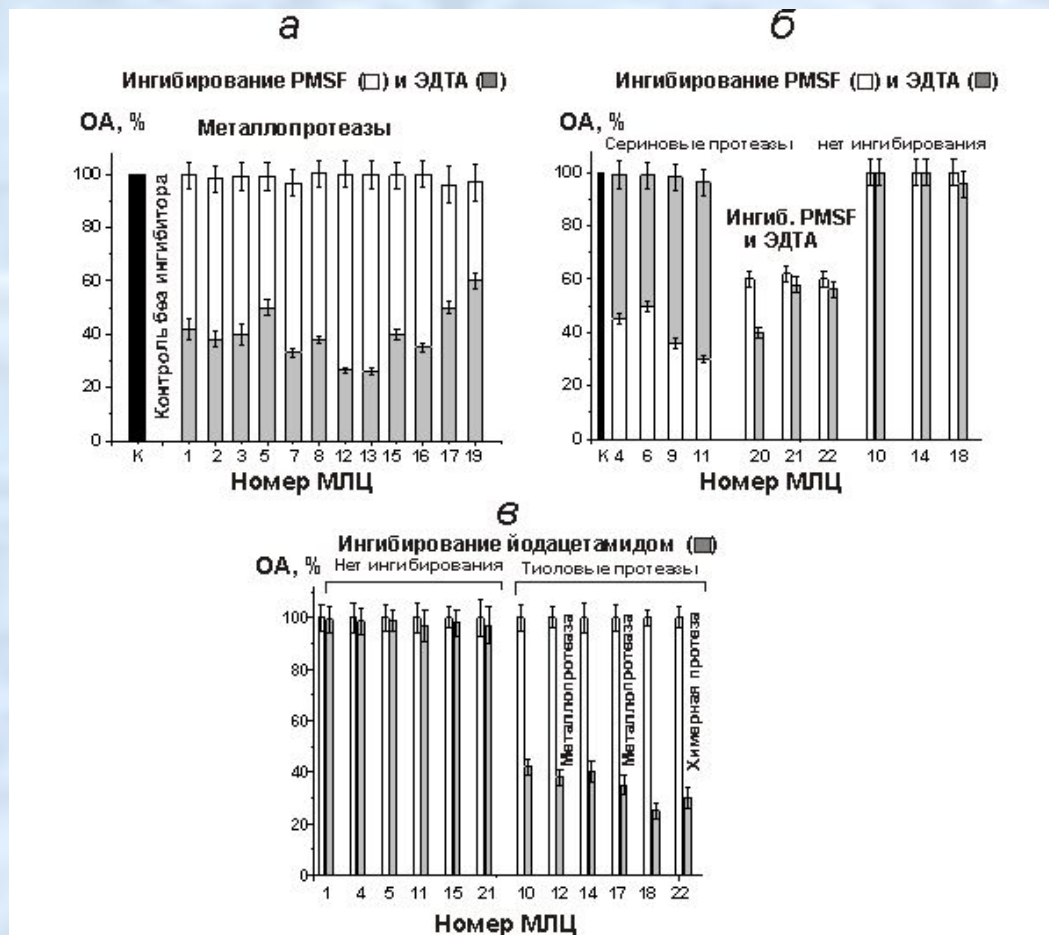
1 2 3 4 5 6 7 8 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; К



1 2 3 4 5 6 7 8 9; 10; 11; К

Номер пика

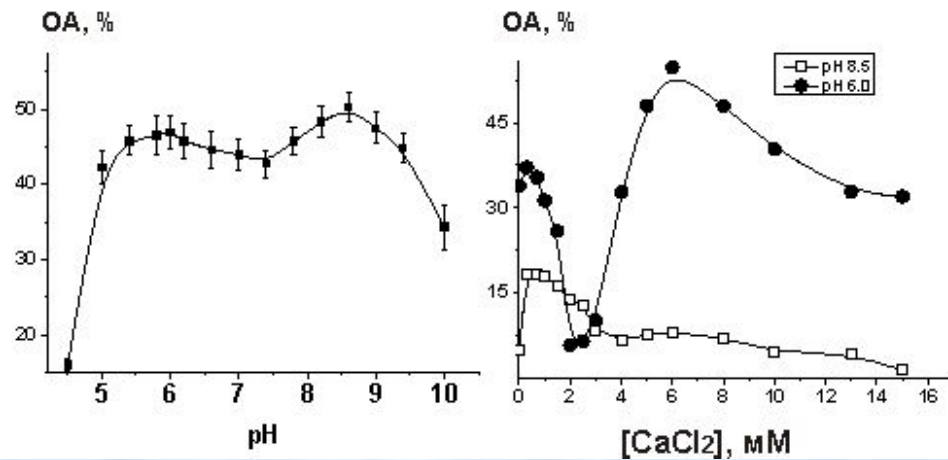
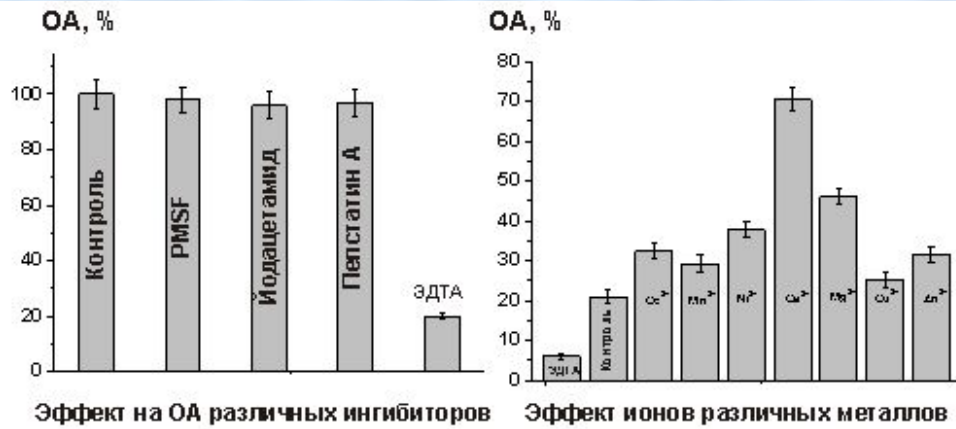
Аффинная хроматография фаговых частиц на ДНК-целлюлозе: (—) и (---), поглощение при 280 нм материала, соответствующего частицам с плазмидами, содержащими и несодержащими кДНК легких цепей, соответственно. Столбики соответствуют относительной активности.



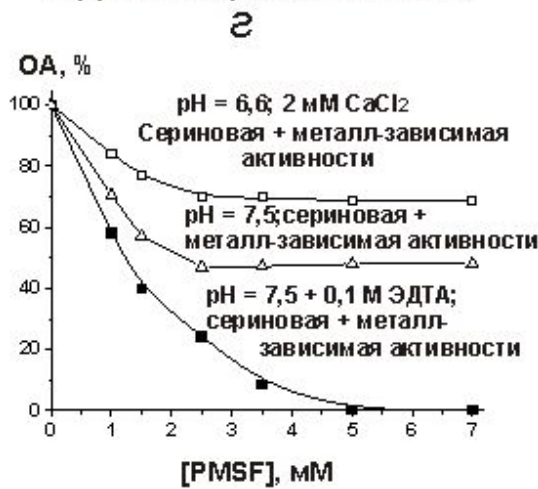
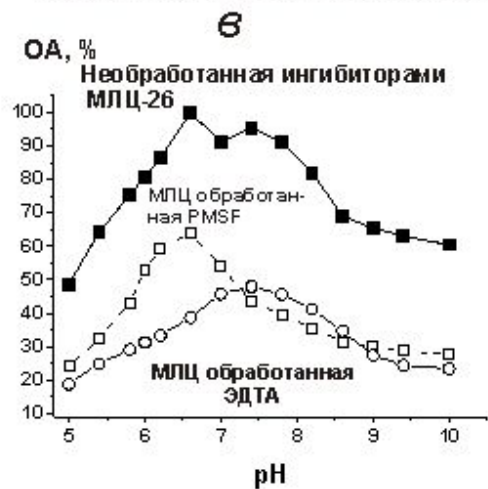
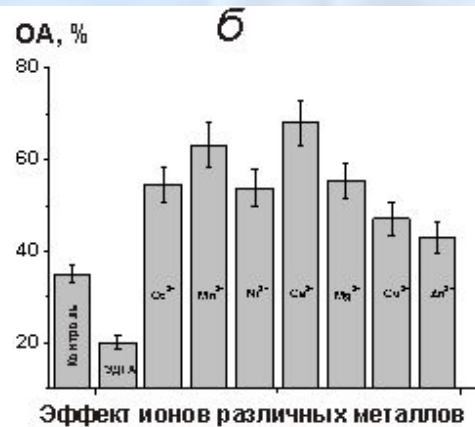
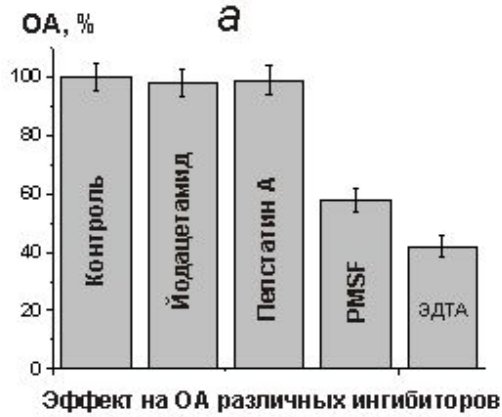
**Относительная активность (OA, %) 22 МЛЦ в гидролизе ОБМ после их предынкубации со специфическими ингибиторами трех типов протеаз; 50 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1 мМ йодацетамид.**

**Было показано, что 12 из 22 препаратов МЛЦ (1–3, 5, 7, 8, 12, 13, 15–17 и 19) являются металлопротеазами; четыре МЛЦ (4, 6, 9, и 11) оказались сериновыми протеазами; Эффекты PMSF и ЭДТА в случае трех МЛЦ (20, 21 и 22) были сопоставимыми: ~40% и 40–60 %, соответственно Совершенно необычными оказались свойства трех других МЛЦ (18, 14 и 10); ЭДТА и PMSF не снижали активности этих препаратов. Они оказались тиоловыми протеазами.**

Относительная активность моноклональной NGTA1-Me-pro в гидролизе ОБМ до и после ее предынкубации со специфическими ингибиторами протеаз четырех типов (а), в присутствии ЭДТА и ионов различных металлов (2 мМ) (б) и при различных рН реакционной смеси (в). Зависимость активности МЛЦ-25 от концентрации  $\text{CaCl}_2$  при 6,0 и 8,5 (г)



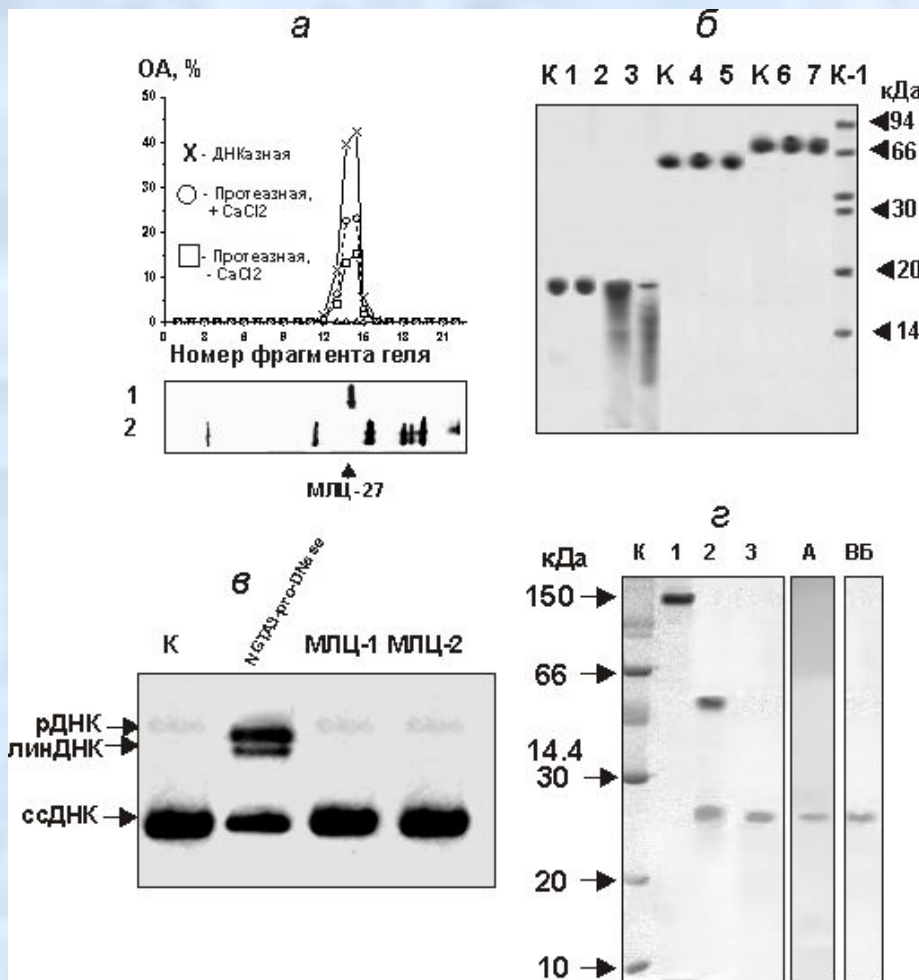
Моноклональная легкая цепь с **двумя активными центрами с металлопротеазной активностью**



Моноклональная легкая цепь с **двумя активностями:** **сериновой** и **металлопротеазной**

Относительная активность (ОА, %) NGTA2-Me-pro-Tr (МЛЦ-24) в гидролизе ОБМ до и после ее преинкубации со специфическими ингибиторами протеаз четырех типов (**а**), в присутствии ЭДТА и ионов различных металлов (2 мМ) (**б**) и при различных pH реакционной смеси до и после обработки с помощью PMSF и ЭДТА (**в**). Зависимость МВР-гидролизующей активности от концентрации PMSF при различных pH реакционной среды (**г**).





**Моноклональная  
легкая цепь с тремя  
активностями:**

- 1) Сериновой**
- 2) Металлопротеазной**
- 3) ДНКазной**

Современная теория кроветворения, основанная на унитарной теории отечественного гистолога А.А. Максимова, различает **шесть классов кроветворных клеток**. Нормальное кроветворение поликлональное, т.е. с одновременным участием многих клеточных клонов. **Все клетки крови происходят из единой родоначальной клетки — полипотентной стволовой кроветворной клетки**. При делении стволовая клетка образует две клетки, одна из них сохраняет свойства стволовой, а другая обладает способностью к дифференцировке во все без исключения клетки крови.

1. **Мегакариоцитарному**, заканчивающемуся образованием тромбоцитов.
- 2) **Эритроидному**, приводящему к формированию безъядерных, переносящих кислород эритроцитов крови;
- 3) **Гранулоцитарному** - с тремя дополнительными направлениями дифференцировки, заканчивающимися образованием трех самостоятельных клеточных типов: базофилов, эозинофилов и нейтрофилов.

4) **Моноцитарно-макрофагальному.** На территории костного мозга дифференцировка в данном направлении завершается образованием моноцитов, мигрирующих в кровь; окончательные зрелые их формы в виде тканевых макрофагов локализуются в различных органах и тканях, где они получили специфические названия: гистиоциты соединительной ткани, звездчатые ретикулоциты печени, макрофаги селезенки, макрофаги лимфатических узлов, перитонеальные макрофаги, плевральные макрофаги, клетки микроглии нервной ткани.

5) **Т-клеточному.** Данный росток дифференцировки на территории костного мозга проходит только самый начальный этап развития: формирование предшественника Т-клеток (пре-Т-клеток) от лимфоидной стволовой клетки; основные события по созреванию различных субпопуляций клоноспецифических Т-клеток разворачиваются в тимусе ;

6) **В-клеточному.** В отличие от Т-клеточного направления развития В-клеточная дифференцировка характеризуется практически полной завершенностью; в связи с этим не случайно костный мозг относят к центральному органу иммунитета.

Кроме развивающихся В-клеток в постнатальном костном мозге присутствуют зрелые плазматические и Т-клетки. Следовательно, у человека костный мозг функционирует и как важный вторичный лимфоидный орган.

Большинство антиген-презентирующих клеток также образуется в костном мозге, хотя их гемопоэтический предшественник остается неизвестным.

**Мы будем анализировать пять типов гемопоэтических предшественников**

**1. BFU-E, erythroid burst-forming unit (early erythroid colonies);**

**2. CFU-GM, granulocytic-macrophagic colony-forming unit,**

**3. CFU-E, erythroid burst-forming unit (late erythroid colonies)**

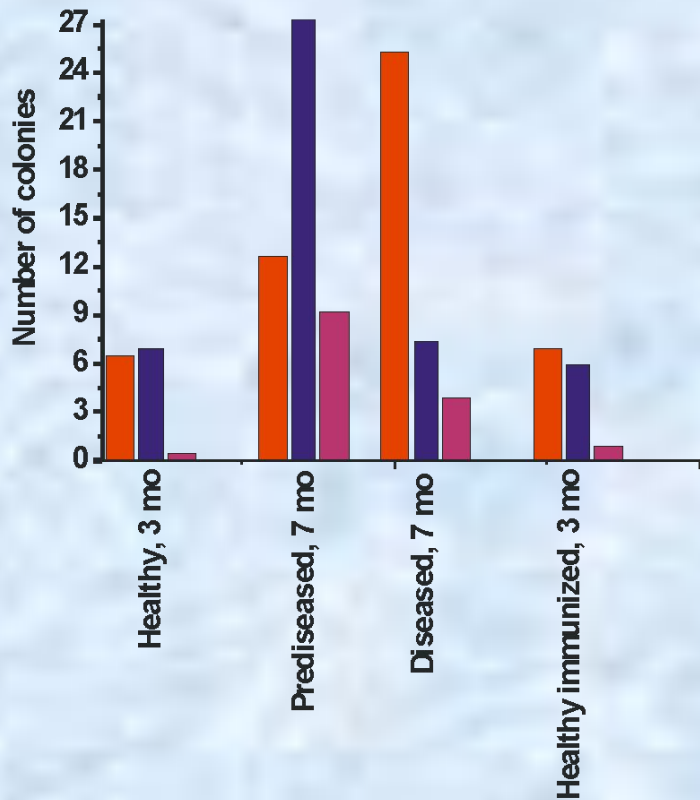
**4. CFU-GEMM, granulocytic-erythroid-megacaryocytic-macrophagic colony-forming unit**

**5. Lymphocytes (T and B-cells)**

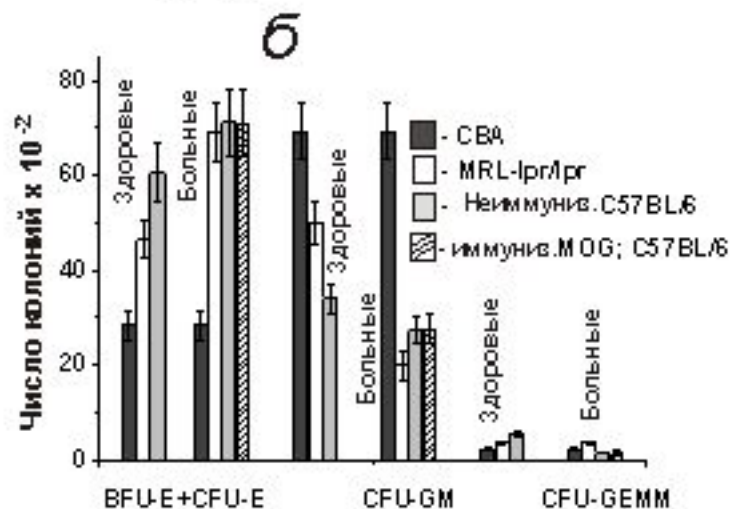
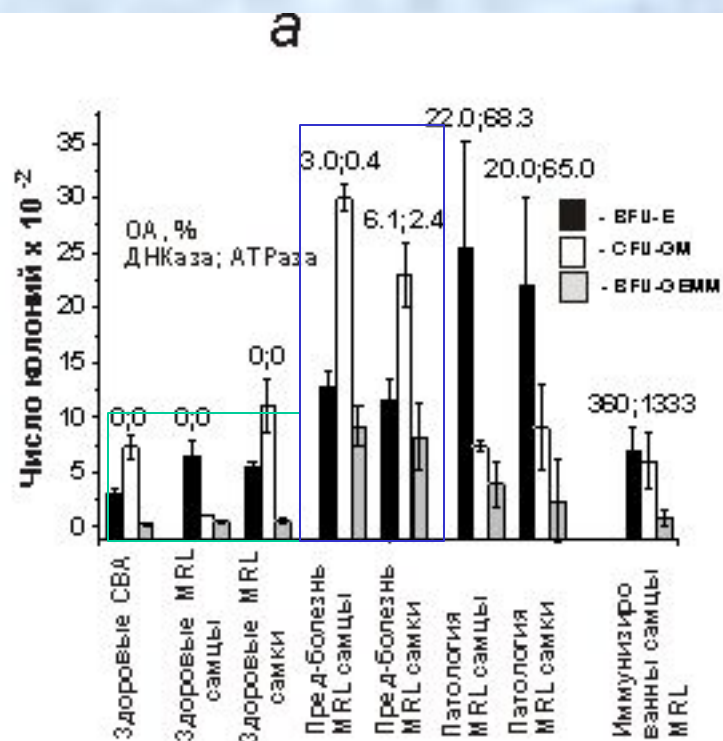
■ - BFU-E  
■ - CFU-GM  
■ - CFU-GEMM

Healthy (2–3 months) <sup>ξ</sup>	6.5 ± 1.5	7.0 ± 1.0	0.5 ± 0.1
Healthy, pre-diseased (7 months) <sup>ξ</sup>	12.7 ± 1.4	30.0 ± 1.3	9.2 ± 1.9
Diseased (7 months)	25.3 ± 9.8	7.4 ± 0.4	3.9 ± 2.0
Immunized (3 months)	7.0 ± 2.1	6.0 ± 2.6	0.9 ± 0.7
	<b>BFU-E</b>	<b>CFU-GM</b>	<b>CFU-GEMM</b>

DNase, % 0            3            22            360  
 ATPase, % 0        0.4        68.3        1330



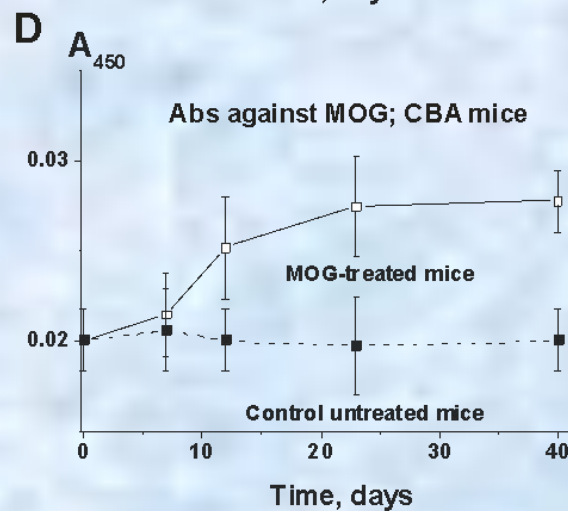
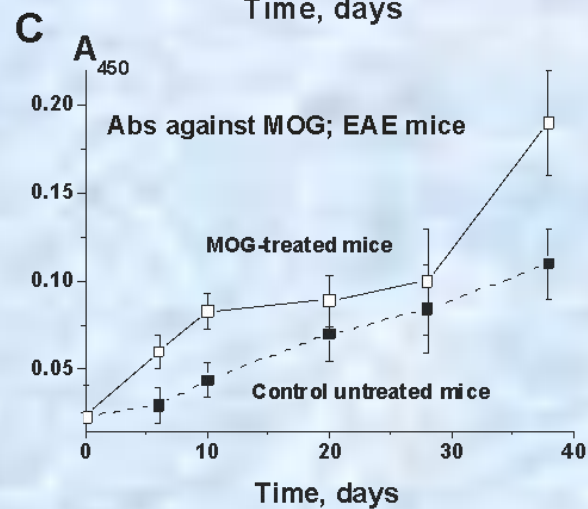
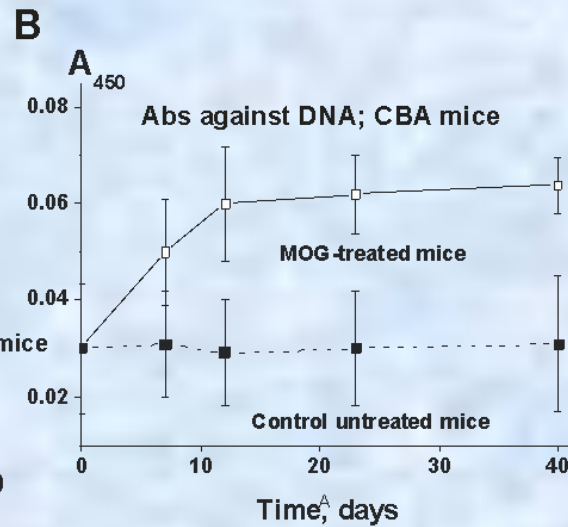
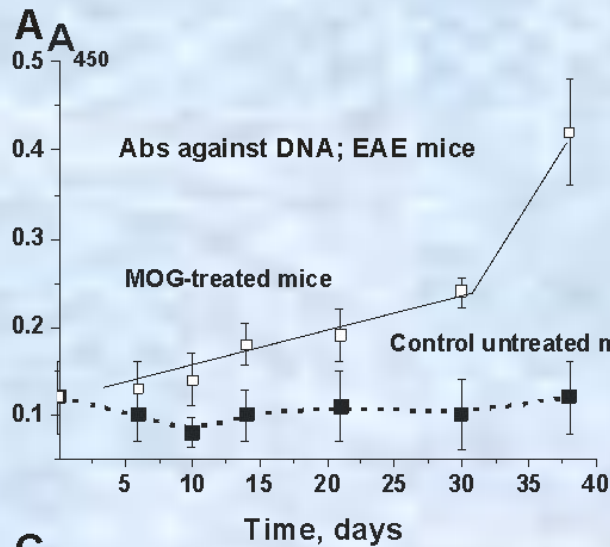
1. В период предболезни (продолжительностью 1-2 месяца), когда еще явных симптомов болезни нет, а активность абзимов достоверно детектируется, резко изменяется профиль дифференцировки стволовых клеток костного мозга и возрастает уровень клеточной пролиферации.
2. Переход от предболезни в спонтанное заболевание ведет к мощному изменению профиля дифференцировки, ассоциированного с появлением визуальных симптомов болезни, повышению протеинурии, титров АТ против ДНК и активности абзимов
3. Иммунизация здоровых мышей не влияет существенным образом на дифференцировку и пролиферацию клеток костного мозга, но приводит к самому мощному увеличению активности абзимов, титров анти-ДНК АТ и протеинурии.



Было показано, что по сравнению с нормой до болезни в состоянии спонтанного появления предболезни у СКВ и ЕАЕ мышей происходит первое, а затем при переходе к глубокой патологии дополнительное изменение профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга

**Профили дифференцировки предшественников гомопоэтических клеток крови BFU-E + CFU-E (total erytroid cells) CFU-GM, BFU-GEMM) в костном мозге MRL-lpr/lpr мышей (a).**

# Обработка ЕАЕ мышей с помощью мышей МОГ вкдет к значительному увеличению титра антител против ДНК и против МОГ



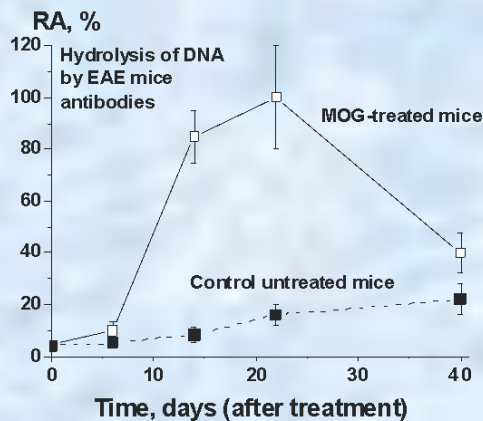
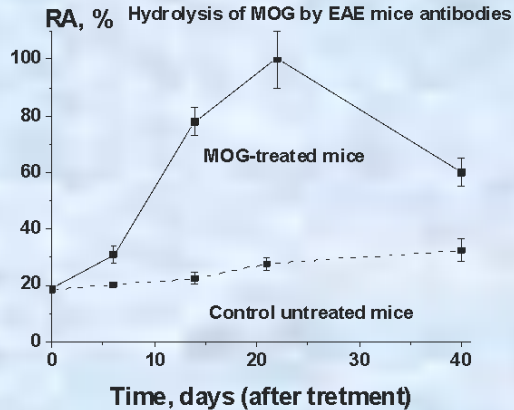
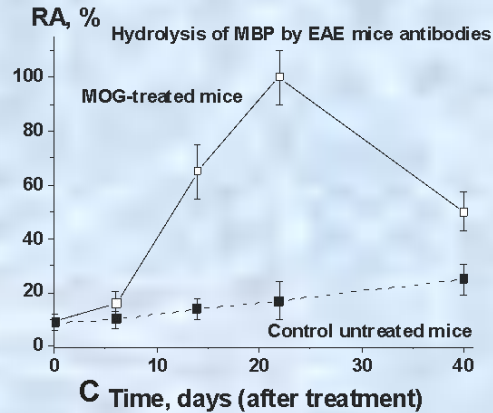
У неаутоиммунных мышей CBA концентрация анти-ДНК и анти-МОГ антител примерно в 7 раз ниже, чем у мышей ЕАЕ, иммунизированных МОГ.

# ГИДРОЛИЗ Основного белка миелина

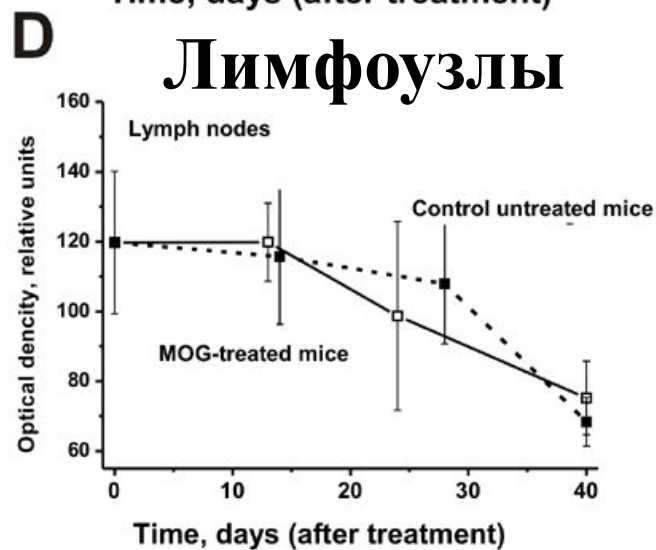
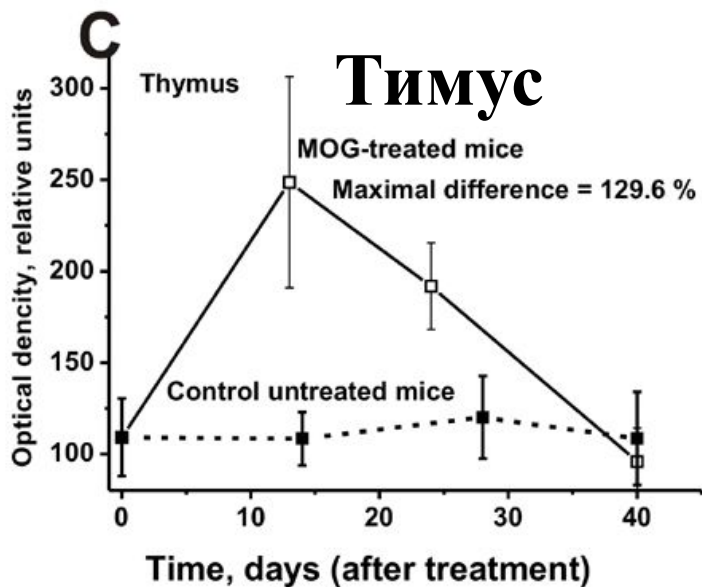
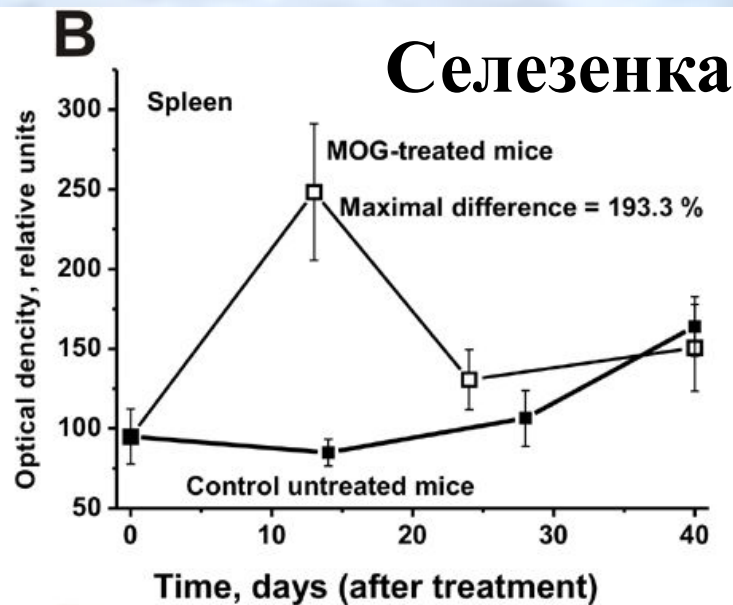
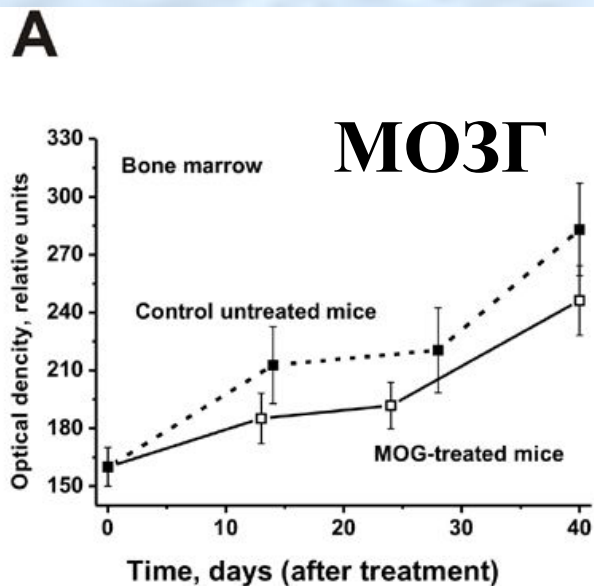
После иммунизации ЕАЕ мышей с помощью МОГ происходит резкая активация болезни по сравнению с контролем

# ГИДРОЛИЗ МОГ

# ГИДРОЛИЗ ДНК

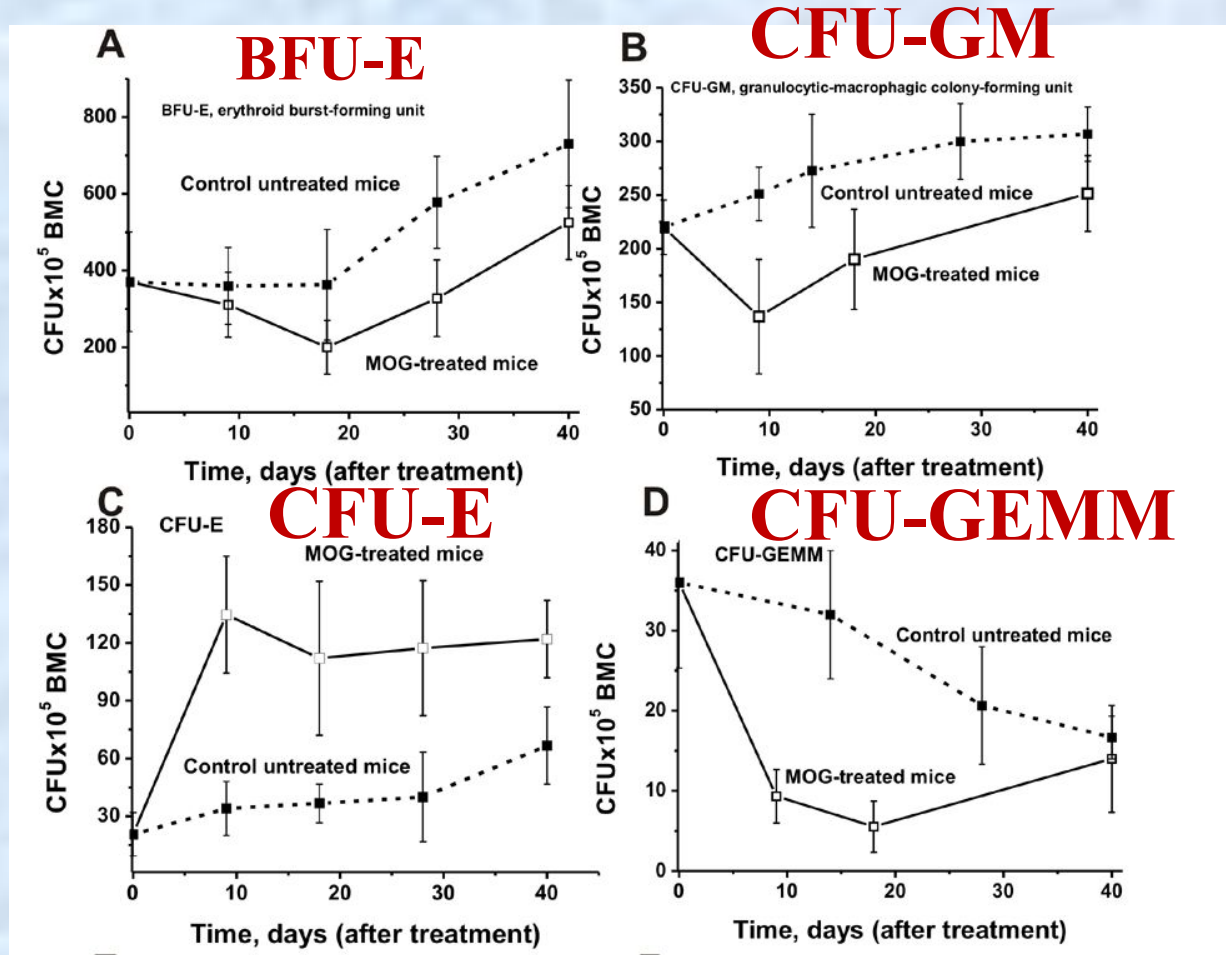


# Пролиферация лимфоцитов разных органах после иммунизации ЕАЕ мышей с помощью MOG



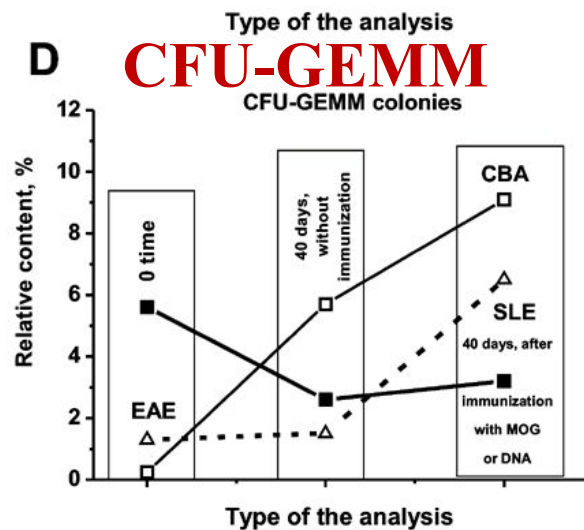
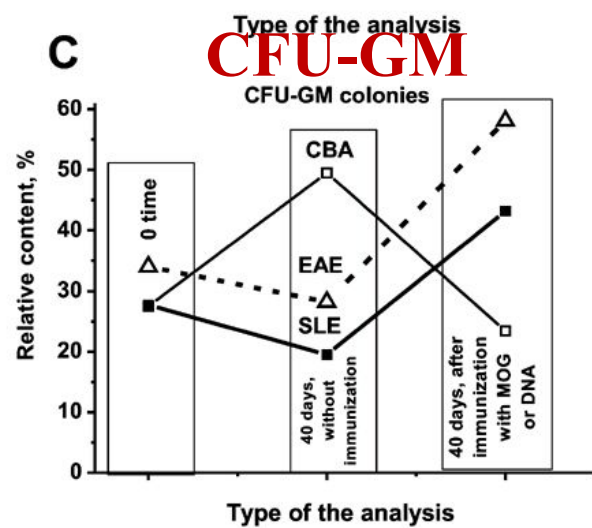
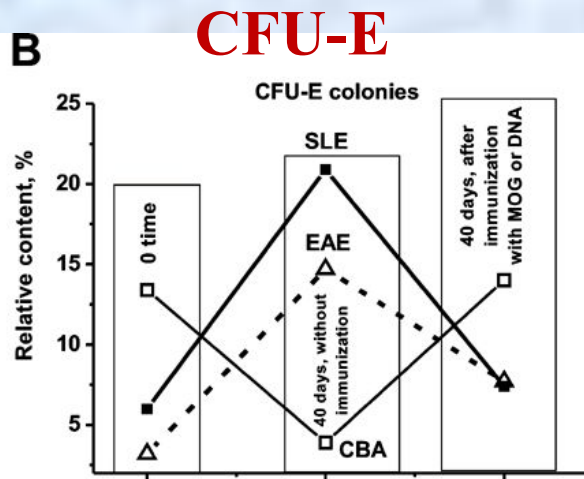
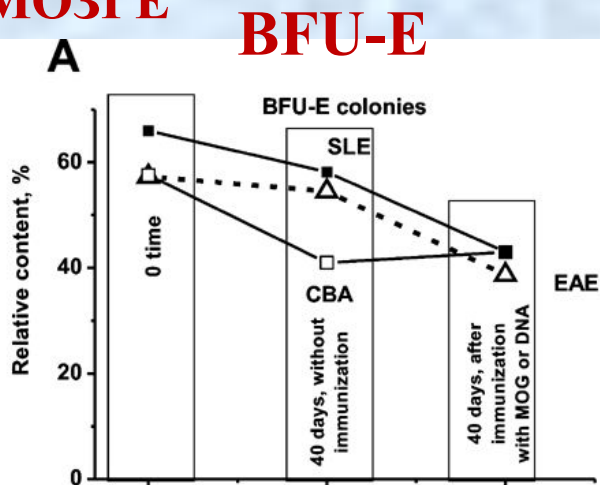


# Дифференцировка стволовых клеток костного мозга с образованием разных предшественников клеток крови до и после иммунизации ЕАЕ мышей с помощью MOG



# Дифференцировка стволовых клеток костного мозга с образованием разных предшественников клеток крови до и после иммунизации SLE EAE и неаутоиммунных мышей с помощью ДНК и MOG

## ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО РАЗНЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ



## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

**Таким образом, аутоиммунные заболевания возникают в результате специфического изменения профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга и увеличения уровня пролиферации лимфоцитов в разных органах, что приводит к образованию каталитических антител**