



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

Основные функции селезёнки:

высвобождЛимфатические 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.

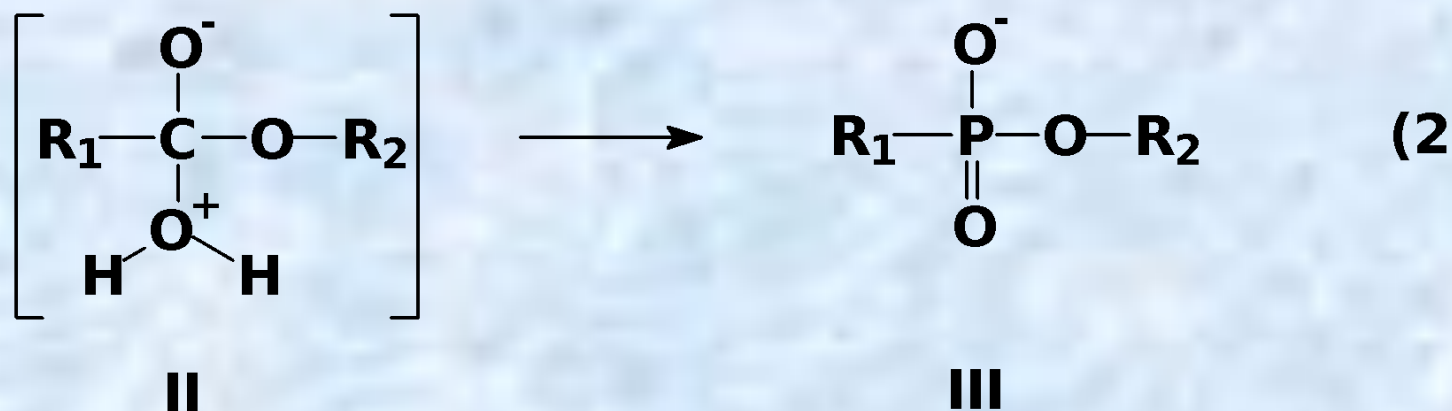
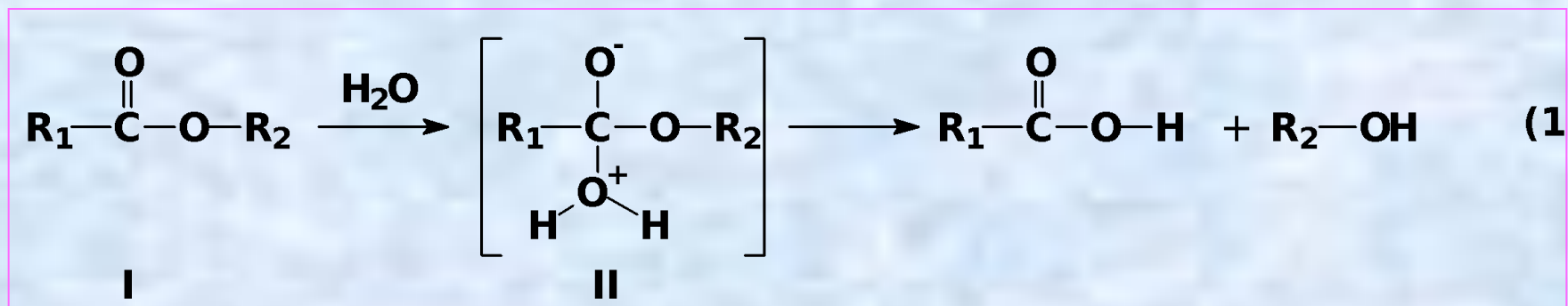
Однако за последние два десятилетия открыты первые природные антитела с каталитической активностью, катализирующие самые разные химические реакции

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

Такие антитела появляются в биологических жидкостях больных различными аутоиммунными заболеваниями

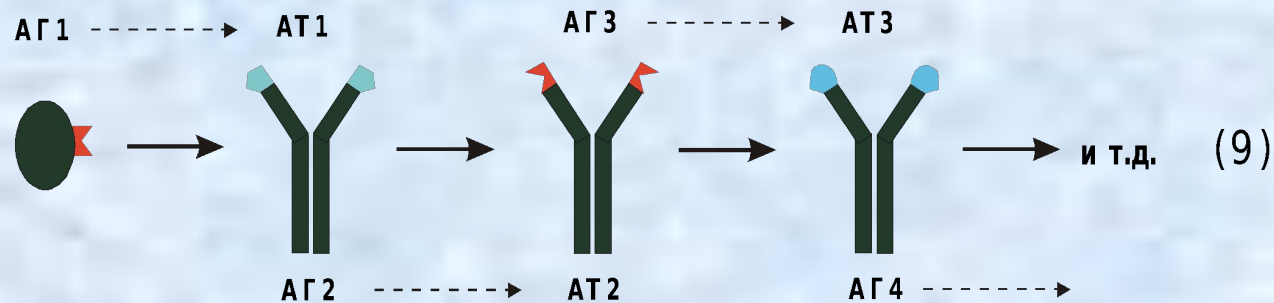
В настоящее время показано существование двух путей наработки антител ферментов.

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 (АТР 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. Аутоимунный тиреоидит (Тиреоидит 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

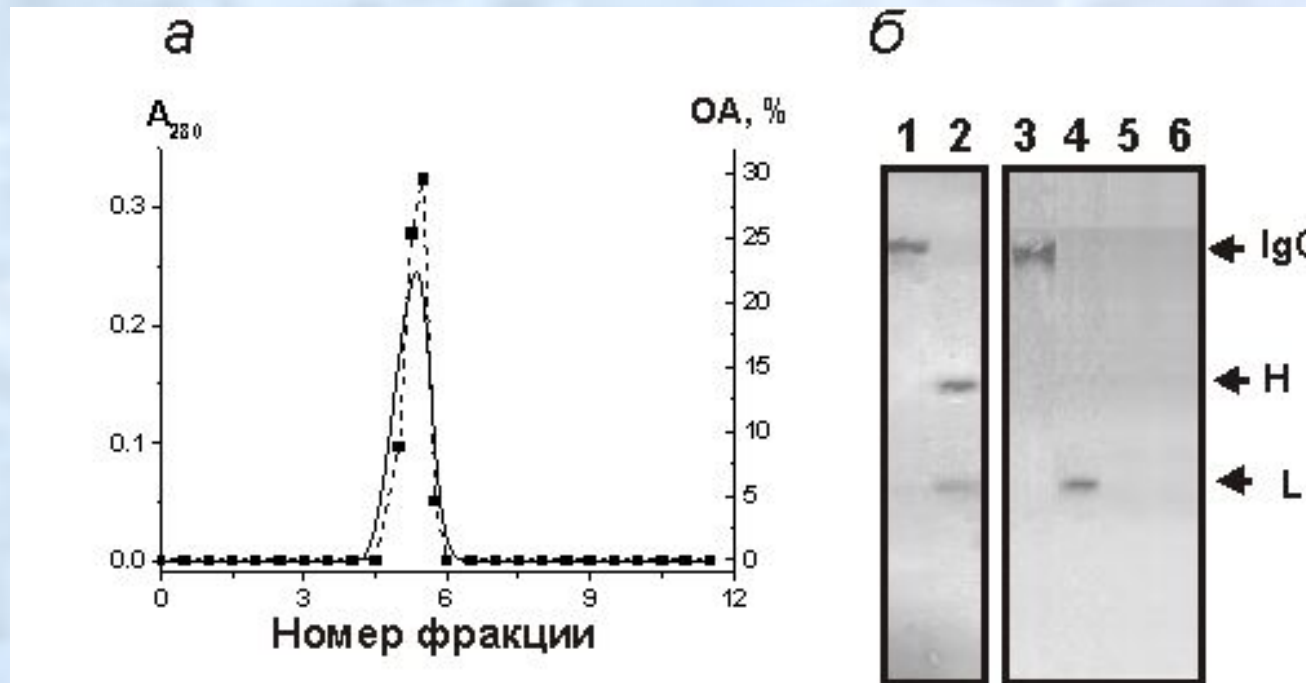
Основные критерии: а) АТ должны быть электрофоретически гомогенными при нанесении на дорожку геля 10-15 мкг и последующей окраске геля серебром;

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 $F(ab)_2$ 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

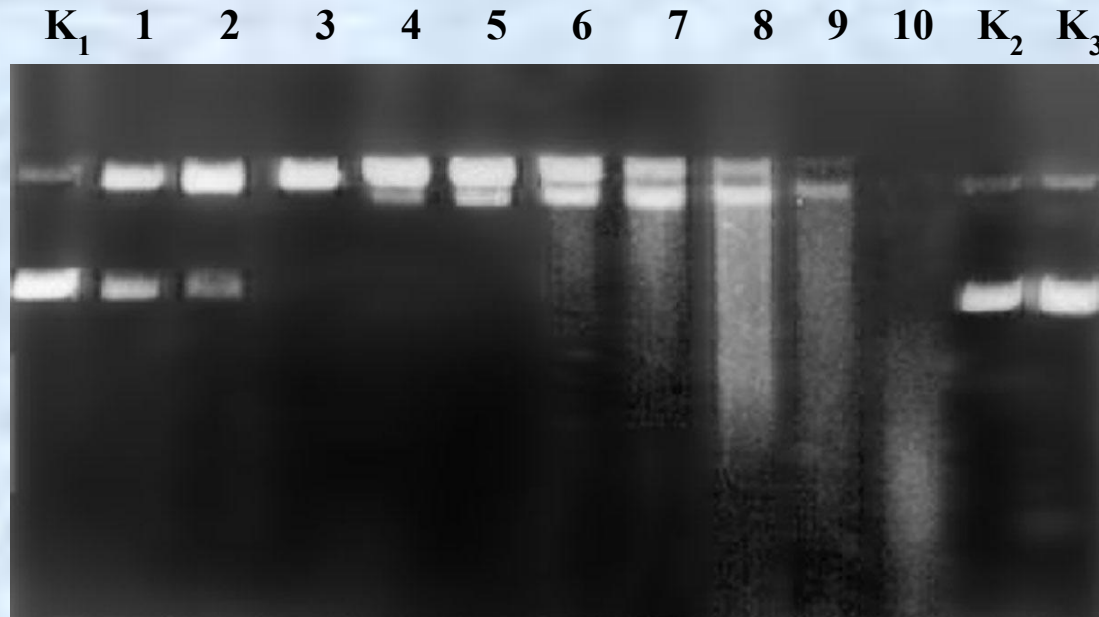


После гель-фильтрации АТ в условиях диссоциации сильных нековалентных комплексов в кислом буфере (рН 2,6) положение пика активности совпадает с таковым для интактных антител

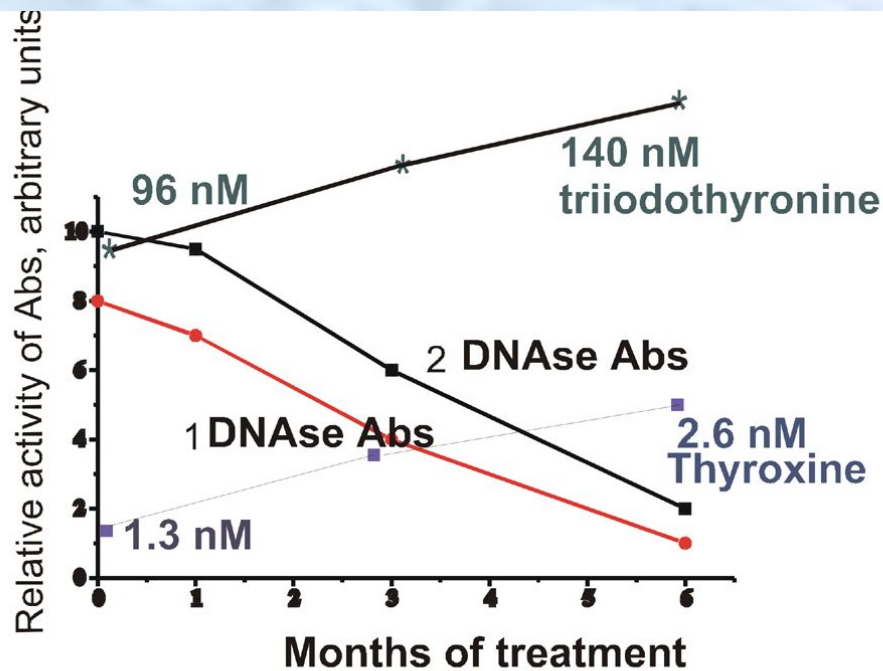
После анализа *in situ* - SDS-PAGE с использованием геля содержащего полимерную ДНК (или РНК) участок геля не содержащий ДНК, в результате ее гидролиза, совпадает с положением интактных антител и их легких цепей.

Относительная активность ДНК-гидролизующих антител очень сильно зависит от пациента

Относительная активность антител 10 пациентов



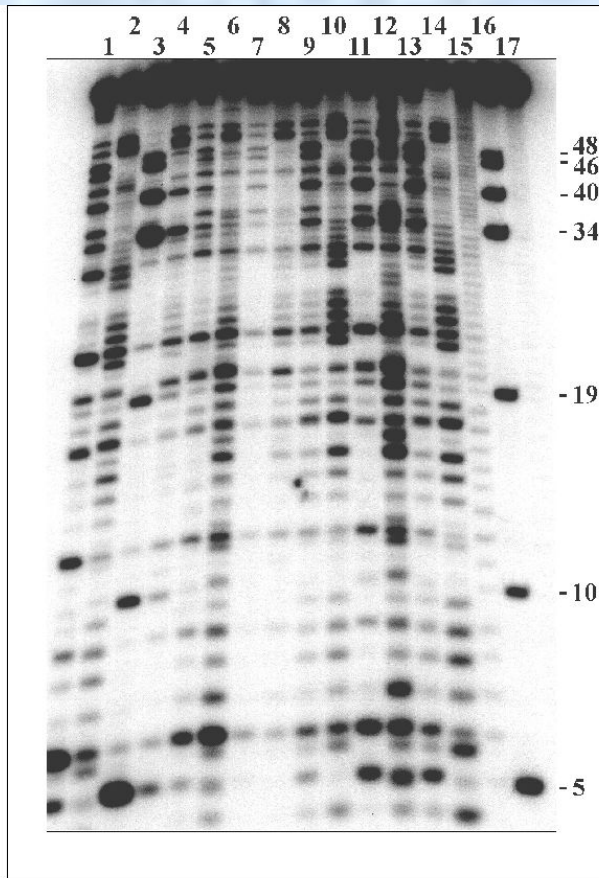
Показано, что анализ относительной активности антител в гидролизе ДНК может быть использован для оценки глубины аутоиммунных реакций при аутоиммунных заболеваниях



Эффект лечения больных аутоиммунным тиреоидитом плаквинилом

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

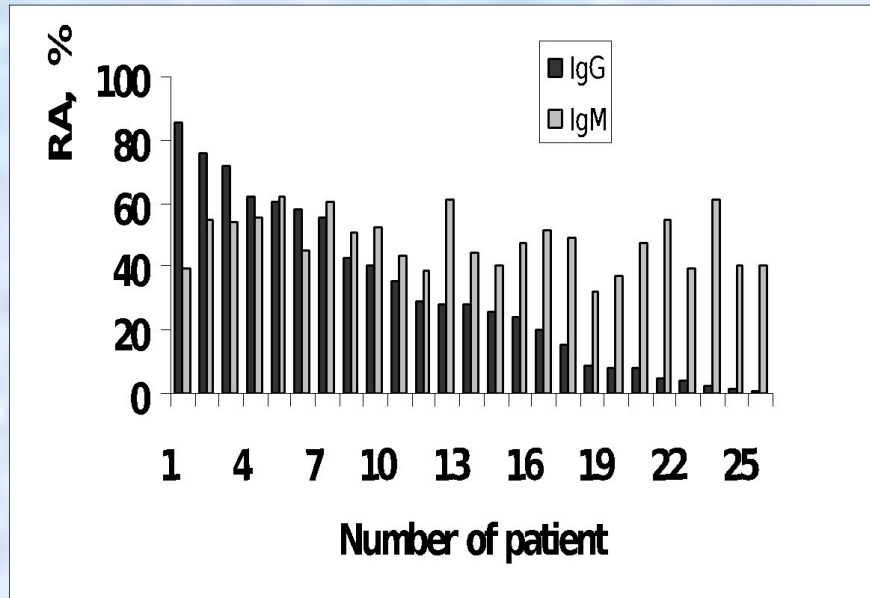
Относительная активность и субстратная специфичность РНК-гидролизующих антител очень сильно зависит от типа аутоиммунного заболевания



**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^{Phe})**

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

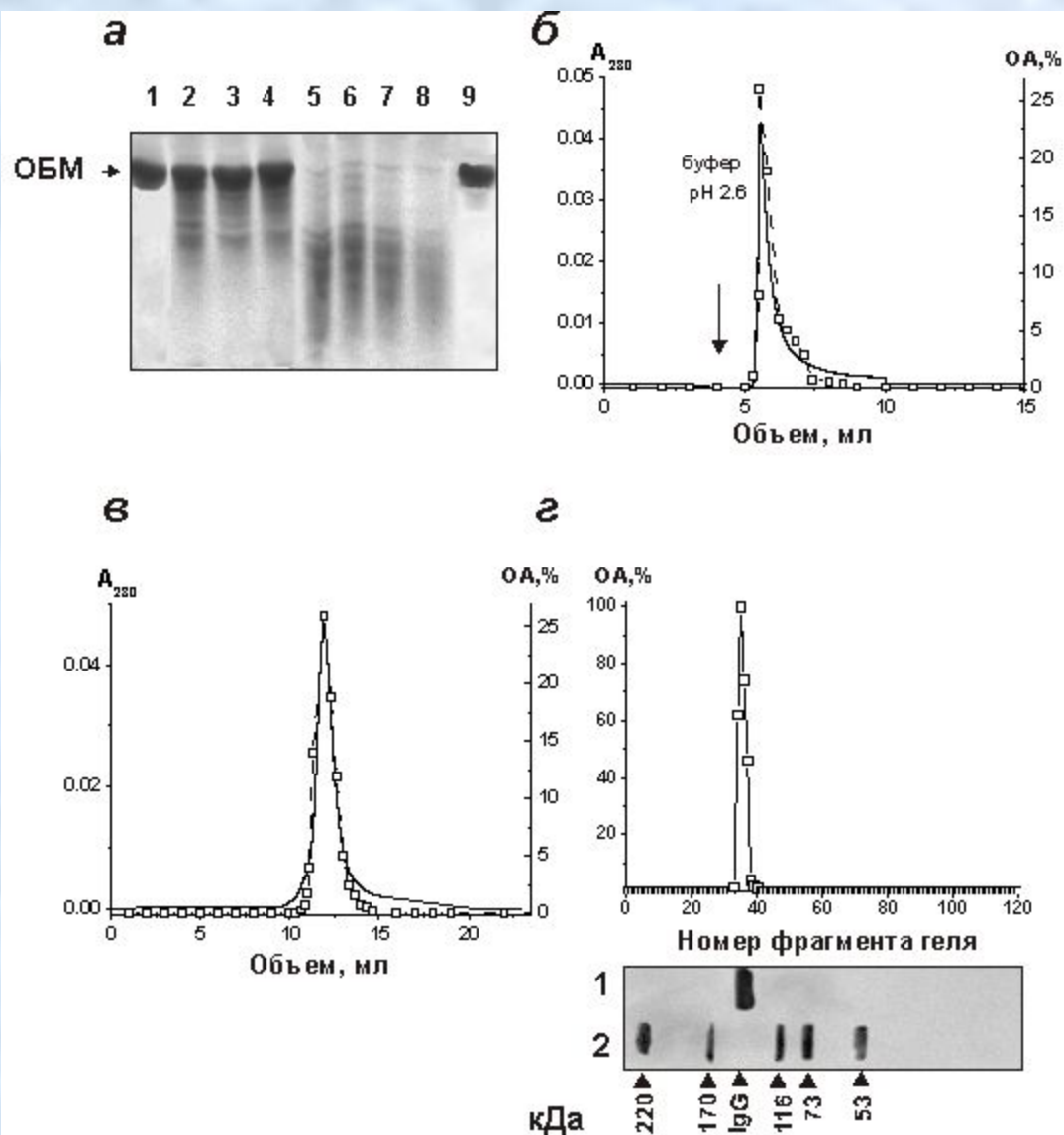
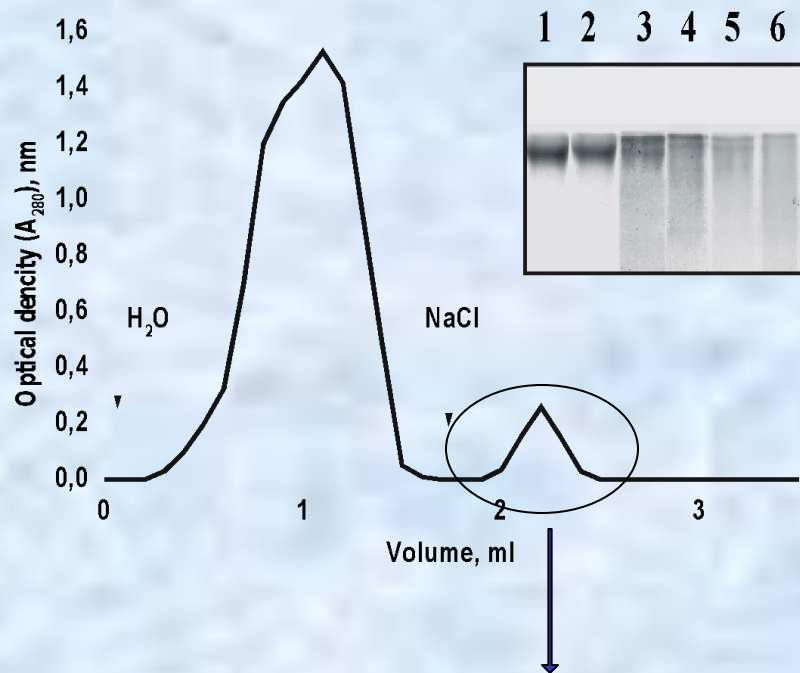


Рис. 2

- 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:

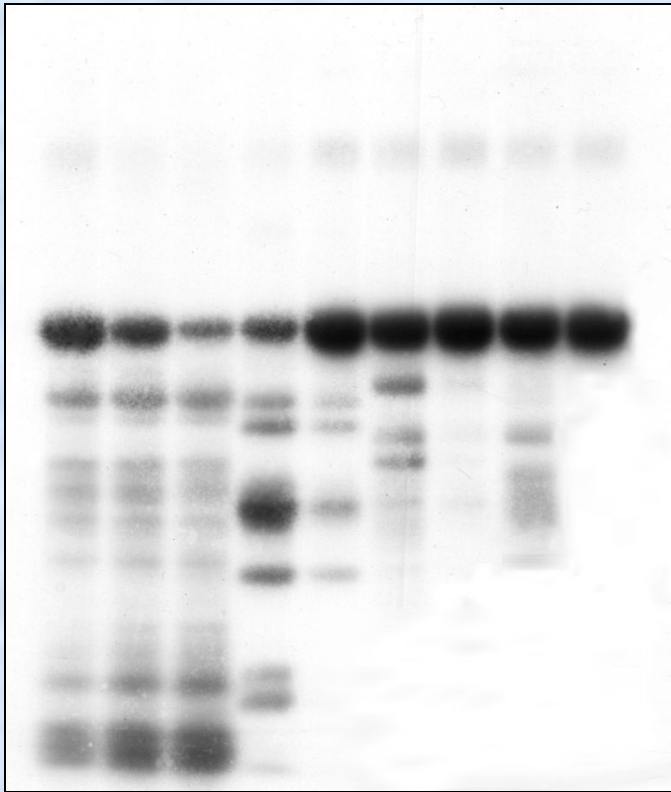
1.Рассеянный склероз

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;

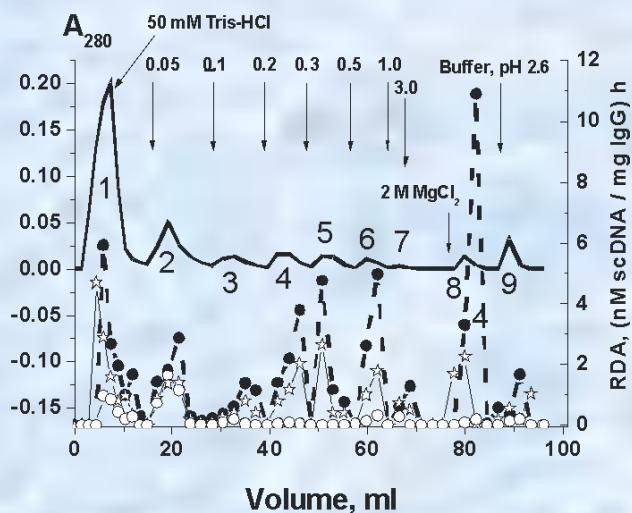
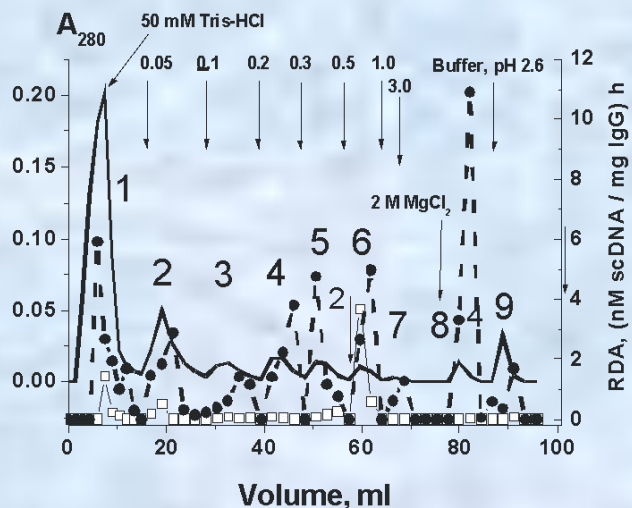
8 – химотрипсин;

9 –контроль без протеазы.

Продукты расщепления антителами и протеазами существенно различаются

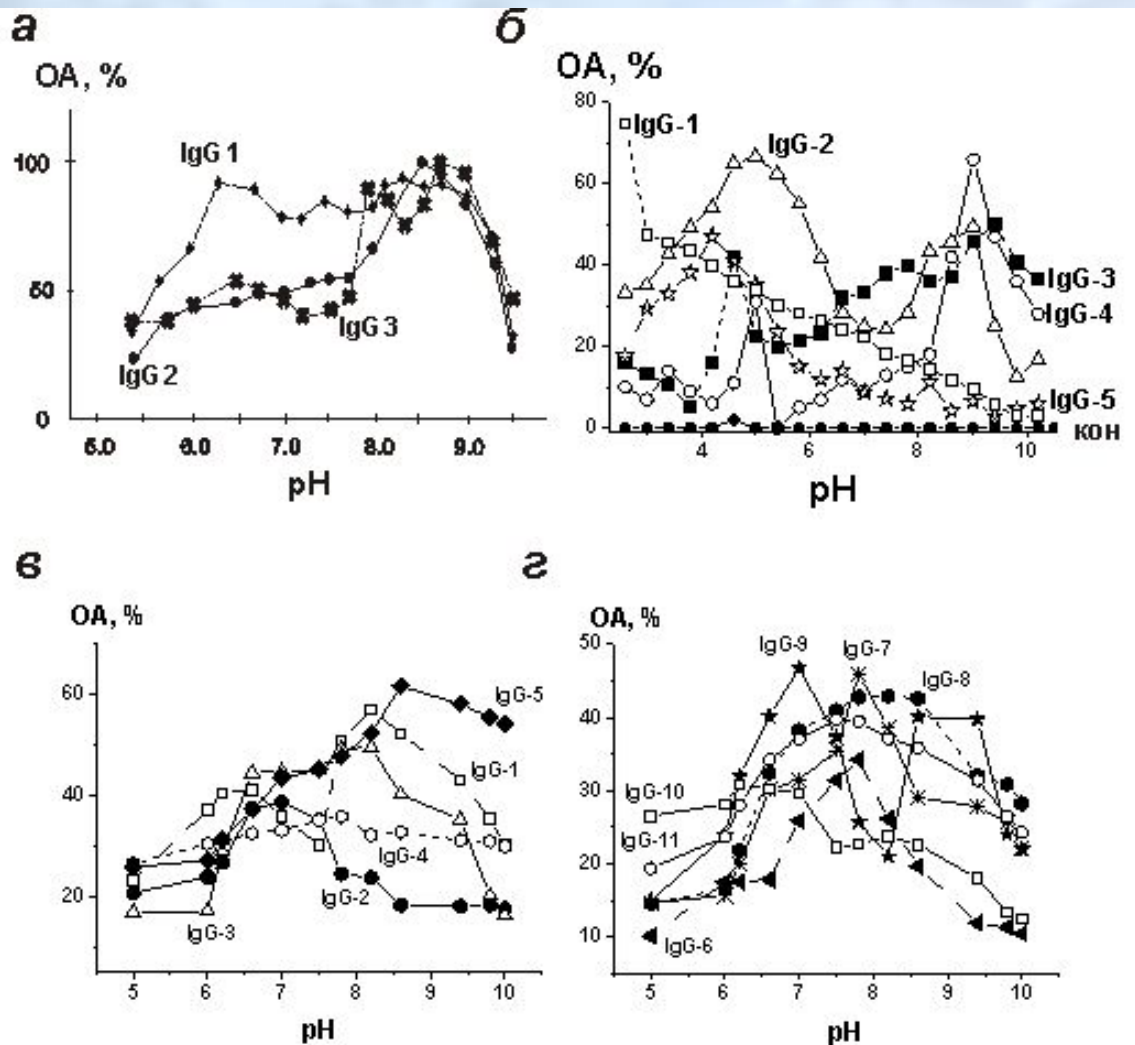
Как указывалось ранее, теоретически количество антител против одного антигена может быть очень большим – до одного миллиона. Реально их образуется в организме человека намного меньше, но все равно много.

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 pH, 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.

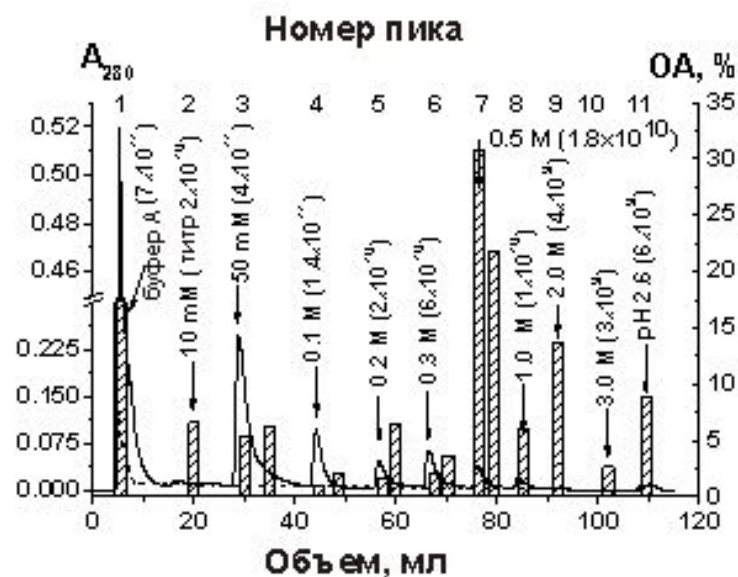
Например, аффинная хроматография антител на ДНК-целлюлозе приводит к разделению IgG с ДНКазной активностью на очень большое число подфракций. Эти подфракции демонстрируют различное сродство к ДНК и различные уровни относительной активности в присутствии и отсутствии ионов разных металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+}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



Множество разных pH оптимумов в гидролизе ДНК антителами из крови разных больных СКВ

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

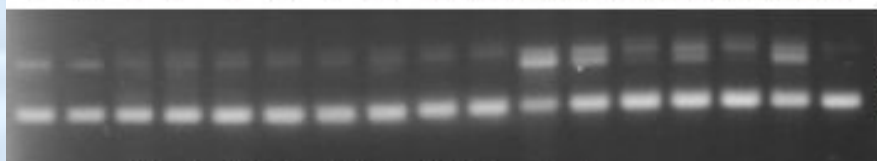
а



б

Номер фракции

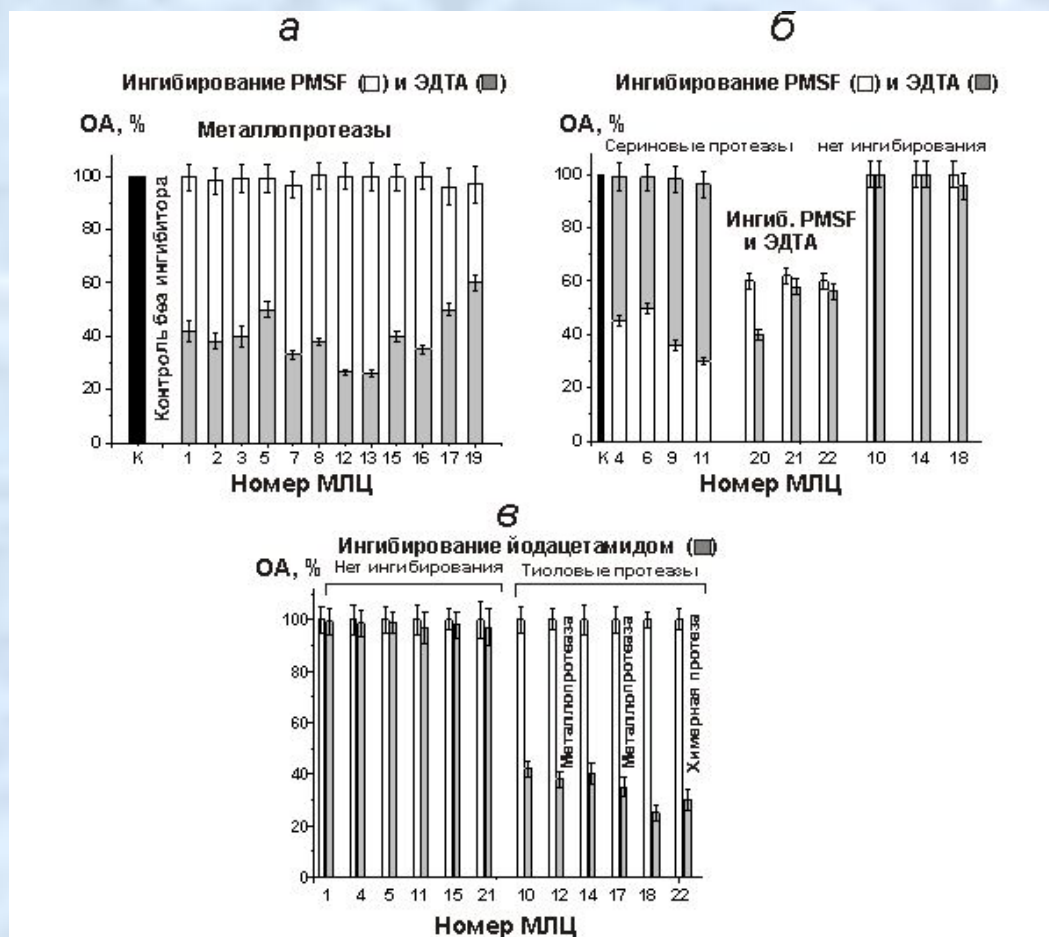
1 2 3 4 5 6 7 8 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; К



1 2 3 4 5 6 7 8 9; 10; 11; К

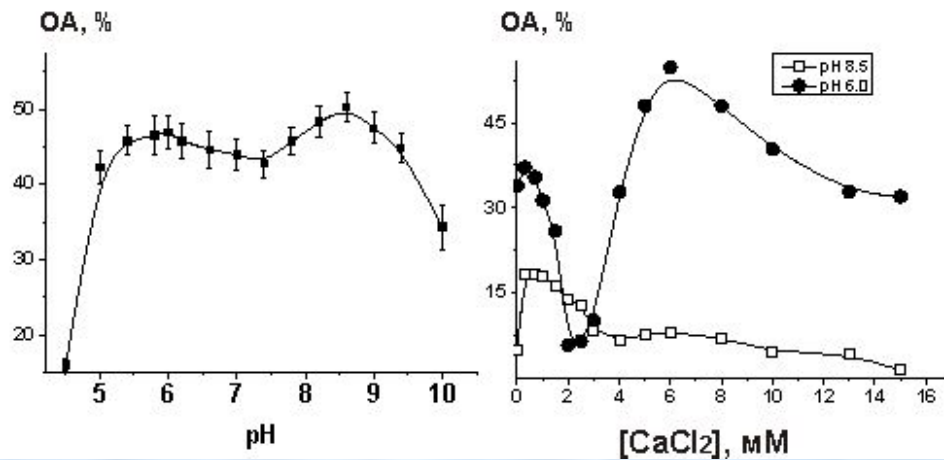
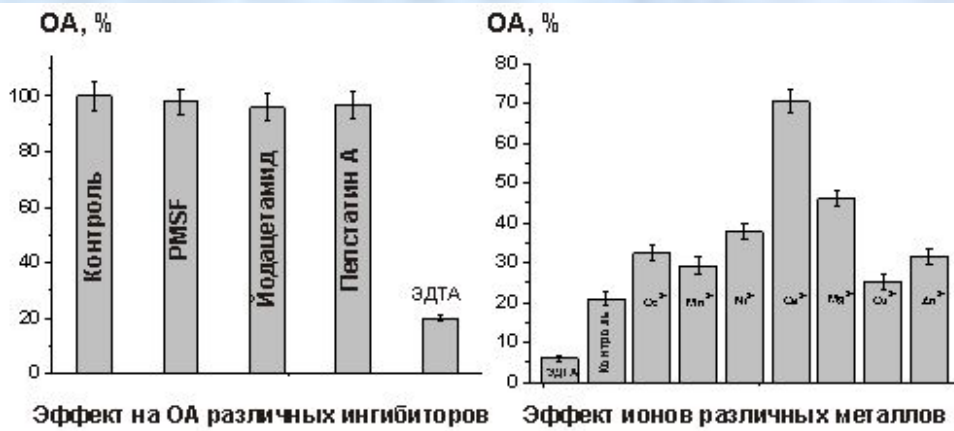
Номер пика

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



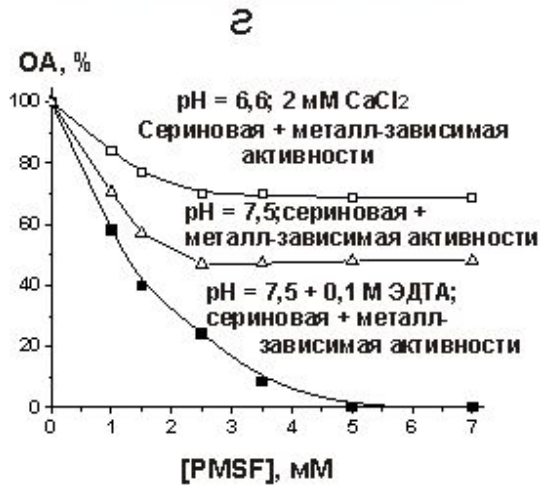
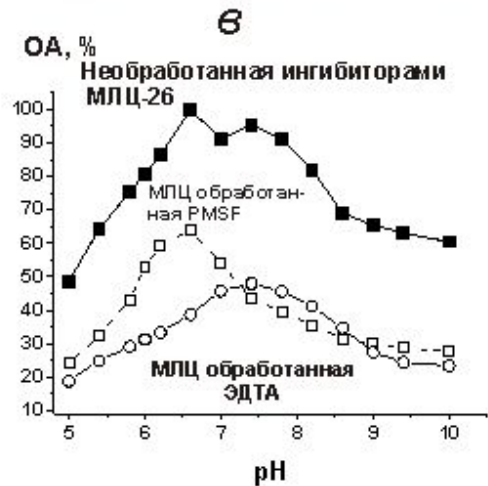
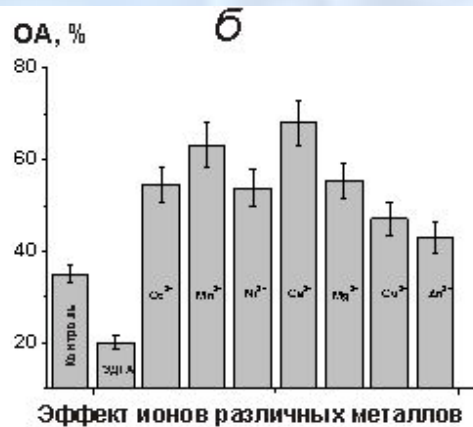
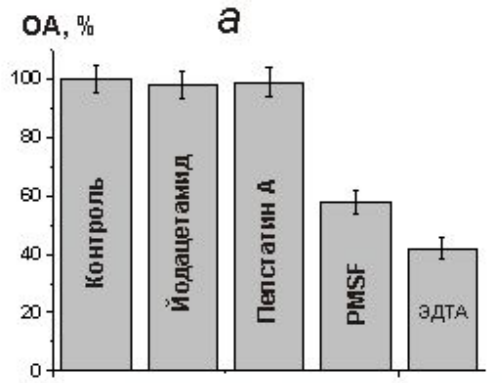
Относительная активность (OA, %) 22 МЛЦ в гидролизе ОБМ после их предынкубации со специфическими ингибиторами трех типов протеаз; 50 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF, 1 мМ йодацетамид.

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.



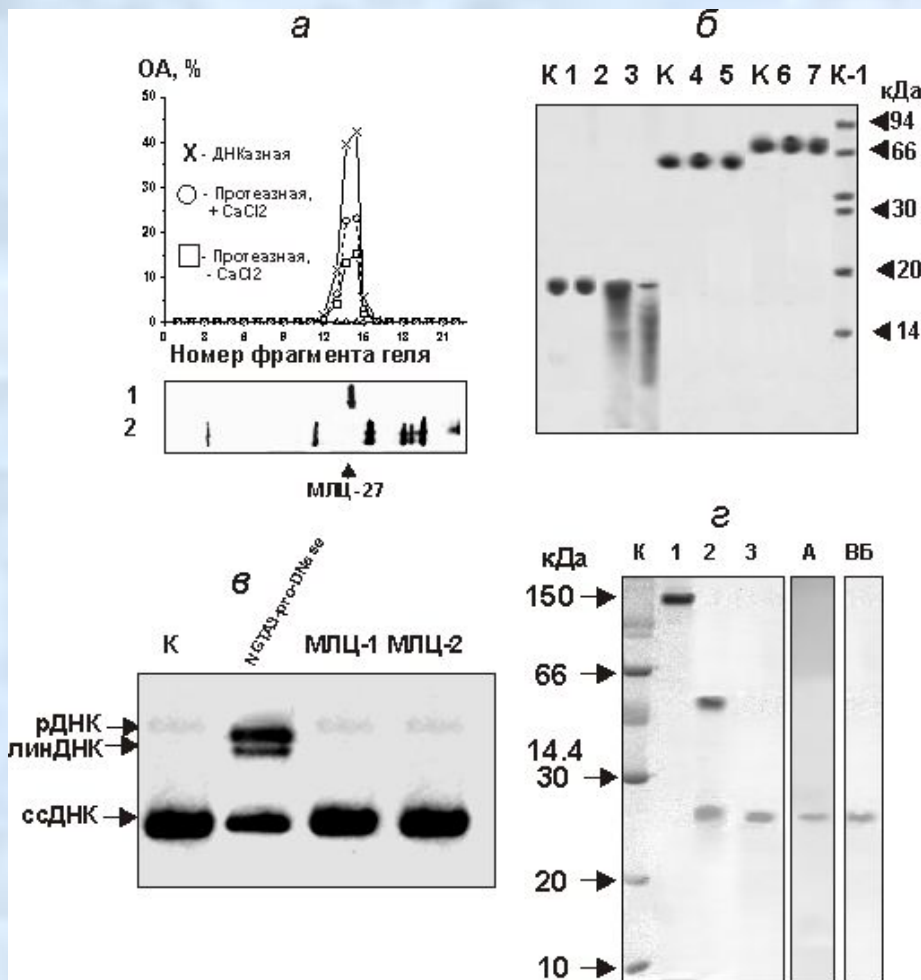
Моноклональная легкая цепь с **двумя активными центрами с металлопротеазной активностью**

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 CaCl_2 при 6,0 и 8,5 (г)



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 прединкубации 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)

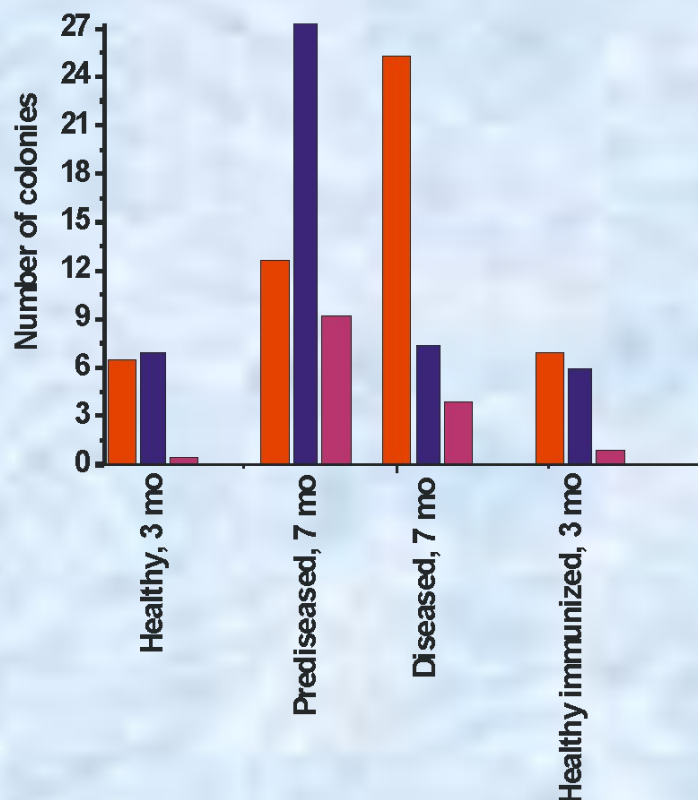
4. CFU-GEMM, granulocytic-erythroid-megacaryocytic-macrophagic colony-forming unit

5. Lymphocytes (T and B-cells)

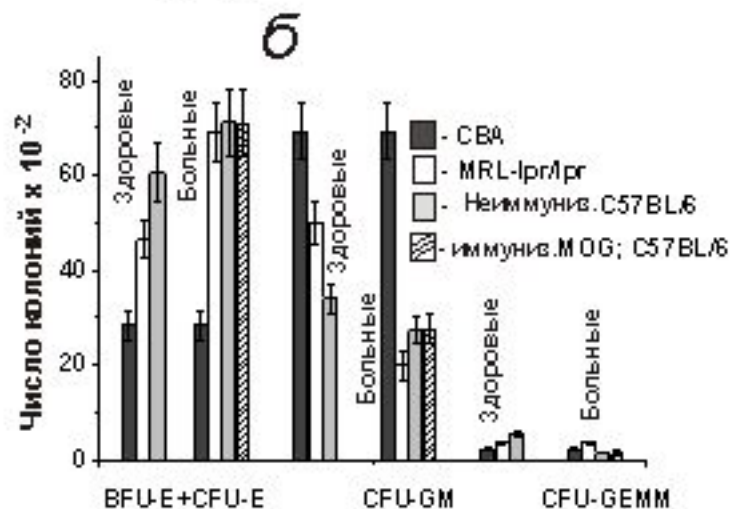
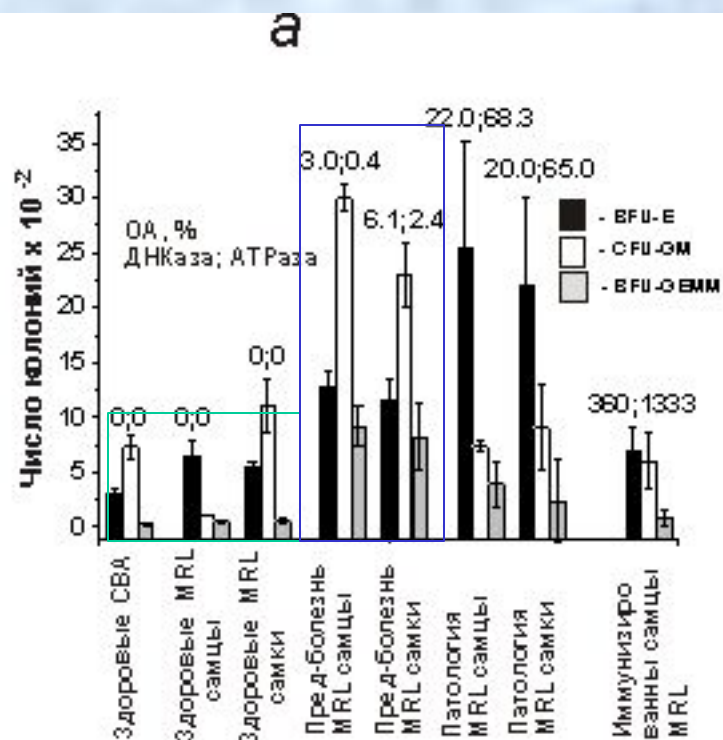
■ - BFU-E
■ - CFU-GM
■ - CFU-GEMM

Healthy (2–3 months) ^ξ	6.5 ± 1.5	7.0 ± 1.0	0.5 ± 0.1
Healthy, pre-diseased (7 months) ^ξ	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
	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM

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



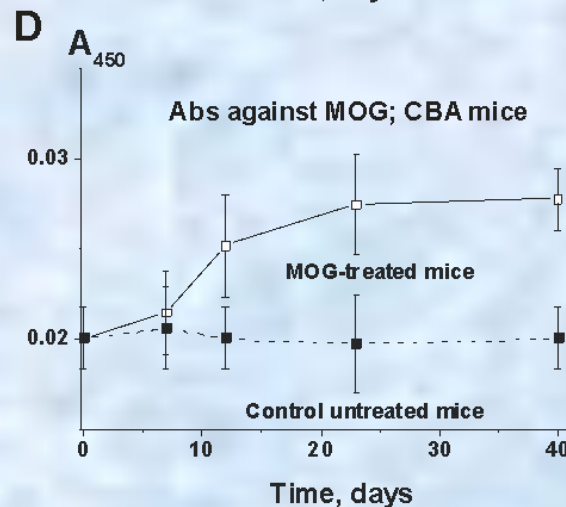
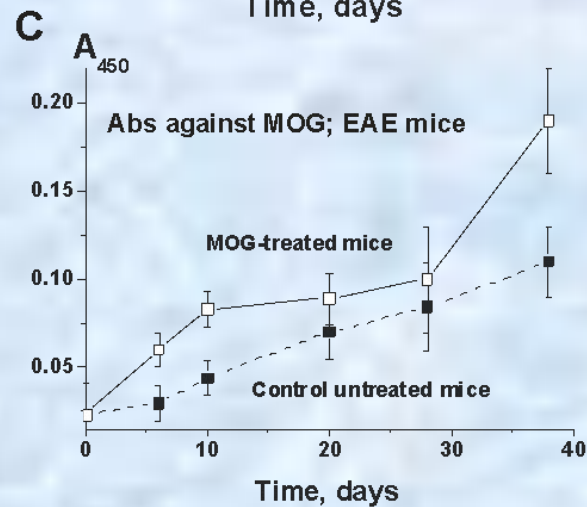
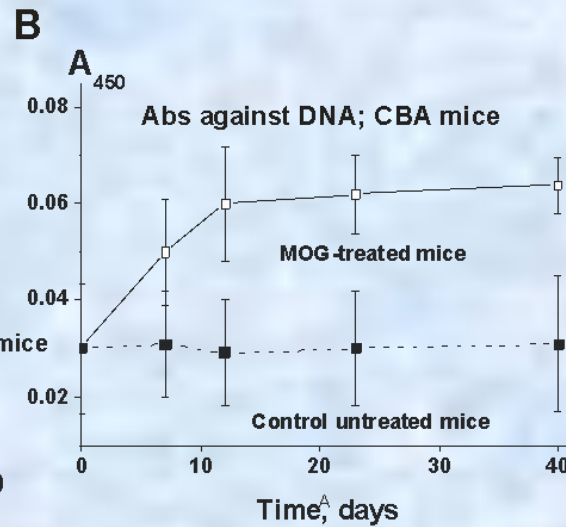
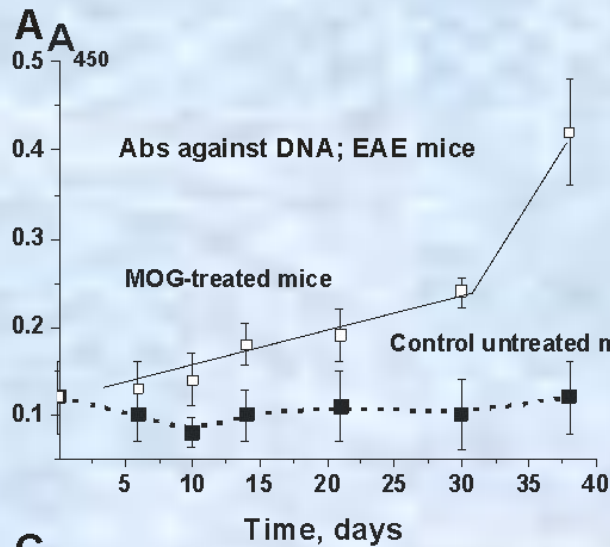
1. В период предболезни (продолжительностью 1-2 месяца), когда еще явных симптомов болезни нет, а активность абзимов достоверно детектируется, резко изменяется профиль дифференцировки стволовых клеток костного мозга и возрастает уровень клеточной пролиферации.
2. Переход от предболезни в спонтанное заболевание 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.



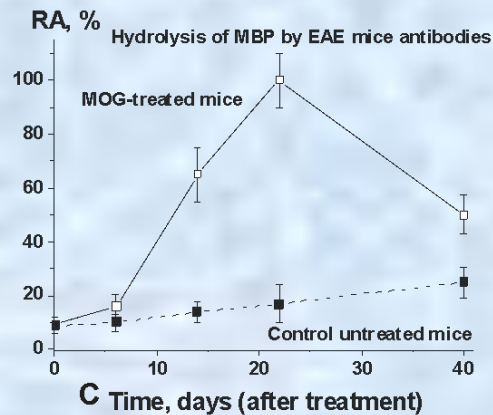
Было показано, что по сравнению с нормой до болезни в состоянии спонтанного появления предболезни у СКВ и ЕАЕ мышей происходит первое, а затем при переходе к глубокой патологии дополнительное изменение профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга

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

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

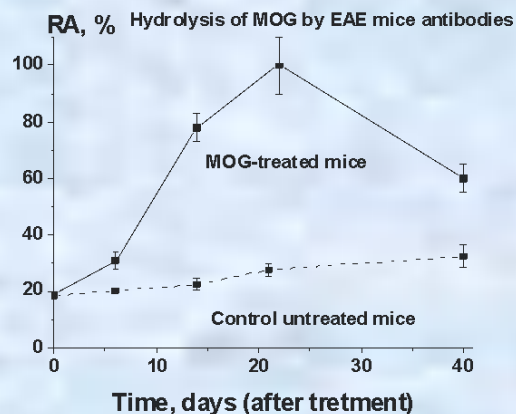


У неаутоиммунных
мышей CBA
концентрация анти-ДНК
и анти-МОГ антител
примерно в 7 раз ниже,
чем у мышей ЕАЕ,
иммунизированных
МОГ.

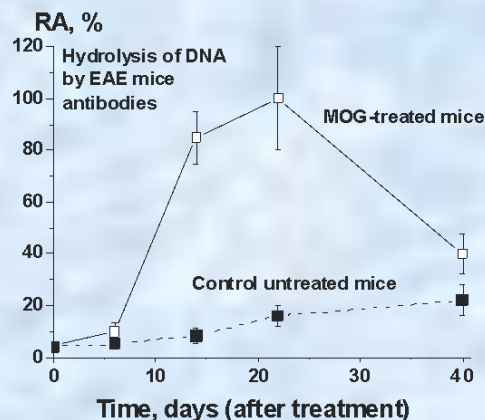


ГИДРОЛИЗ Основного белка миелина

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



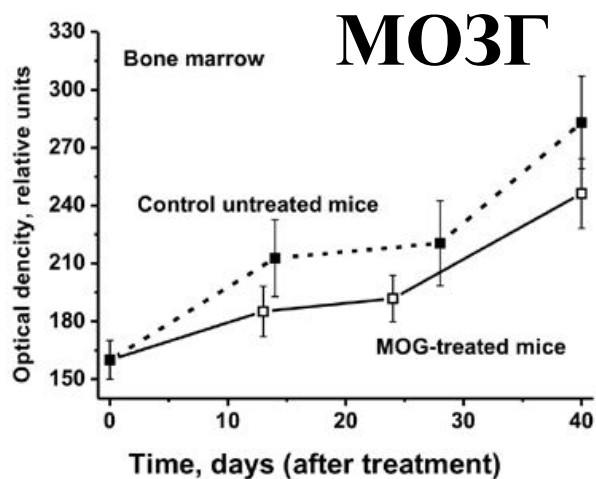
ГИДРОЛИЗ MOG



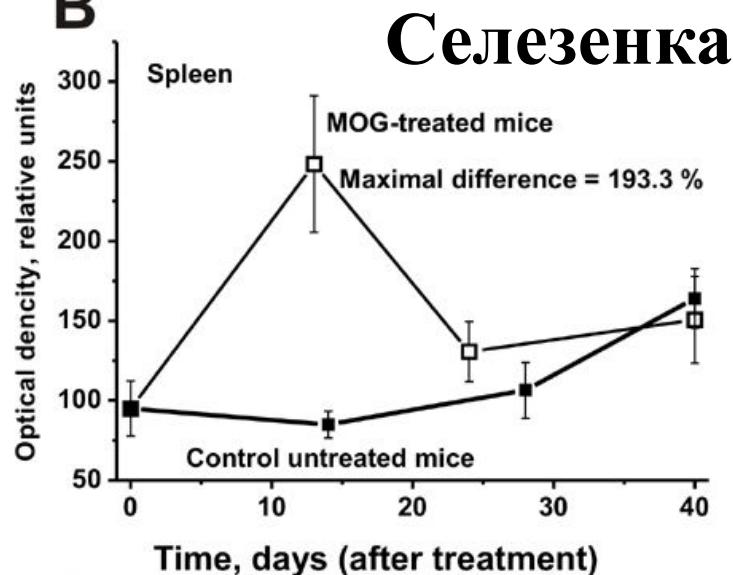
ГИДРОЛИЗ ДНК

Пролиферация лимфоцитов разных органах после иммунизации ЕАЕ мышей с помощью MOG

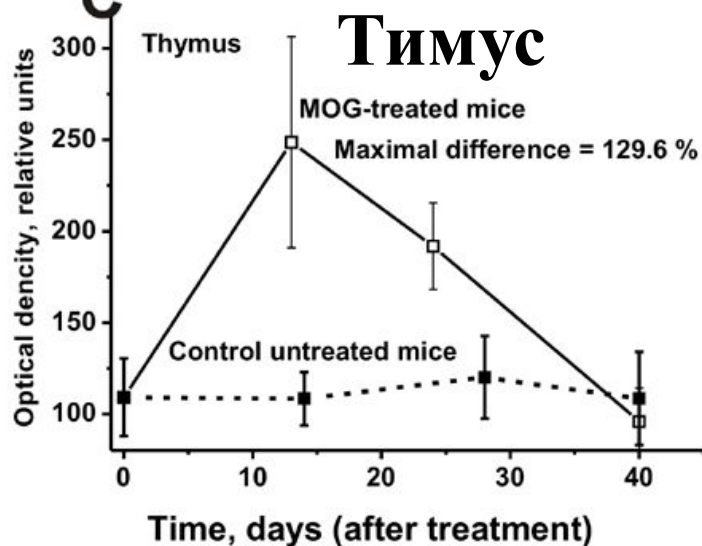
A



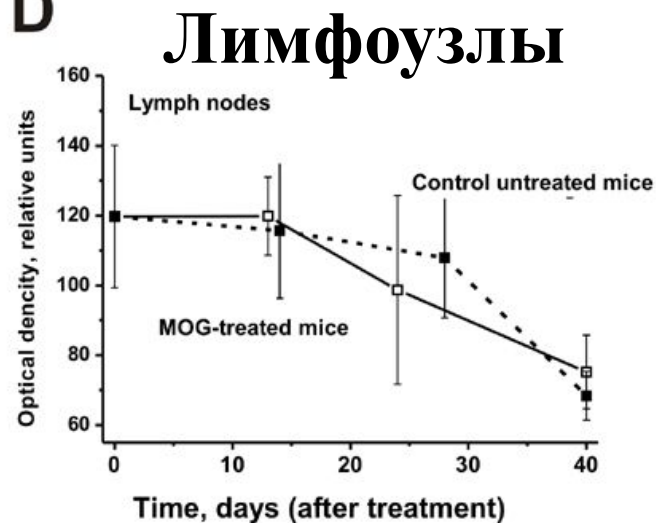
B



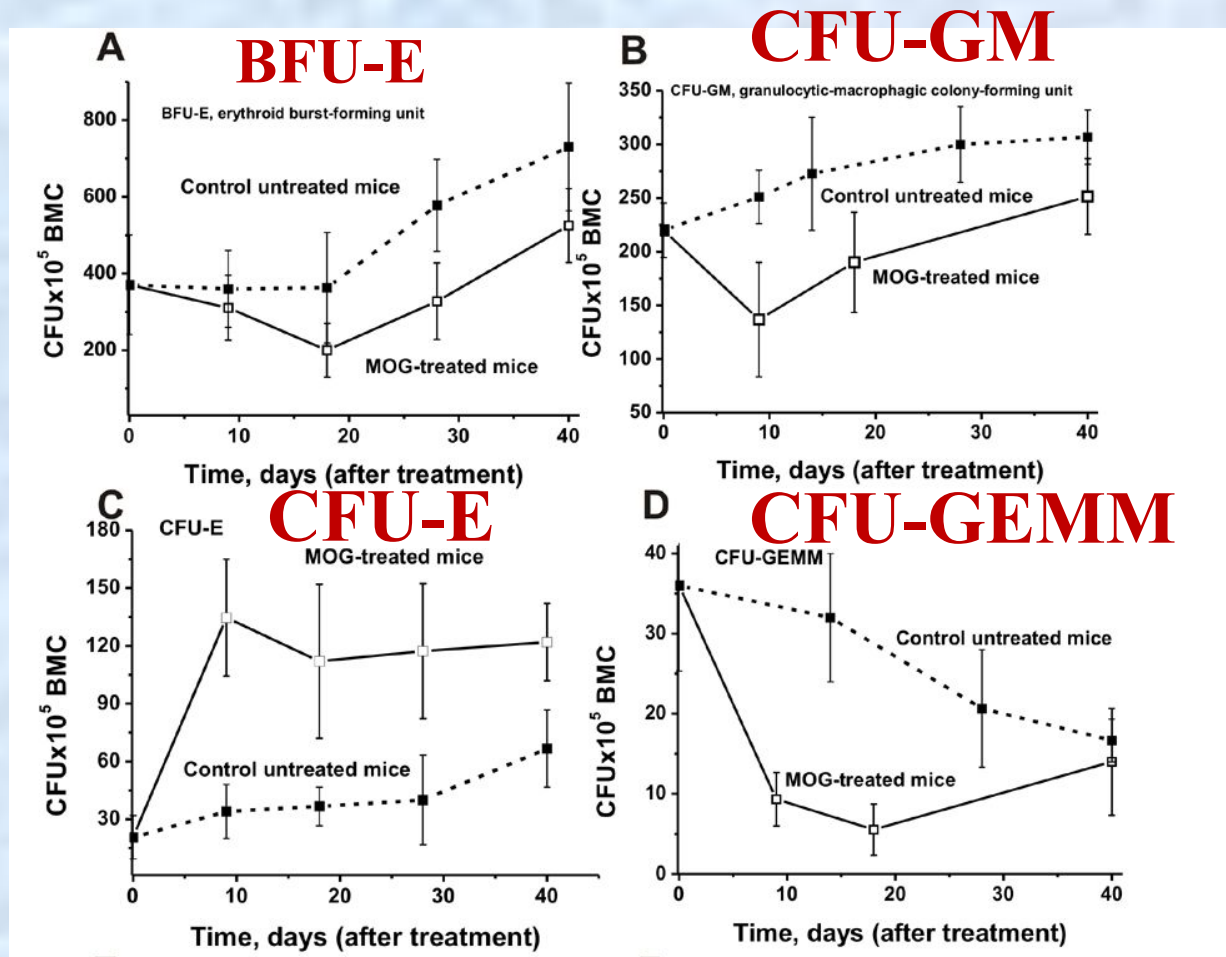
C



D

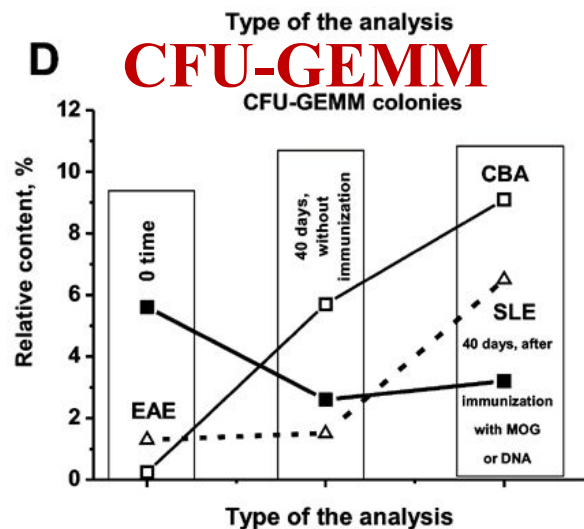
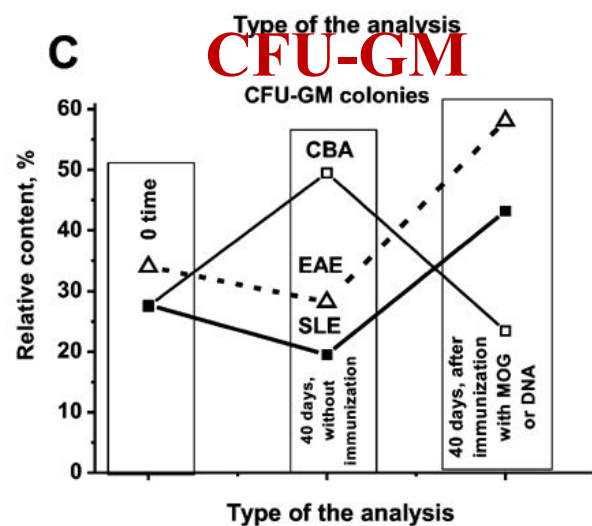
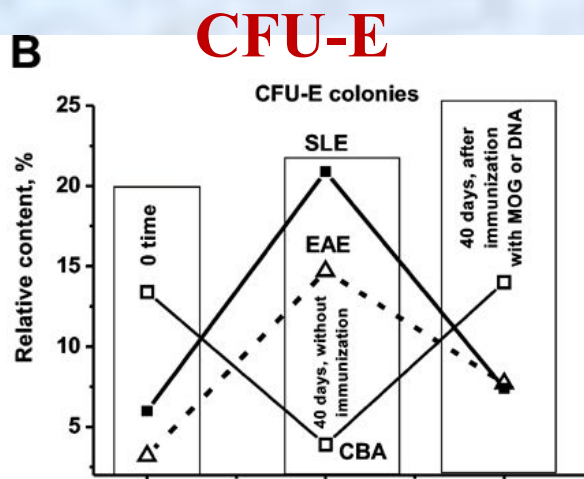
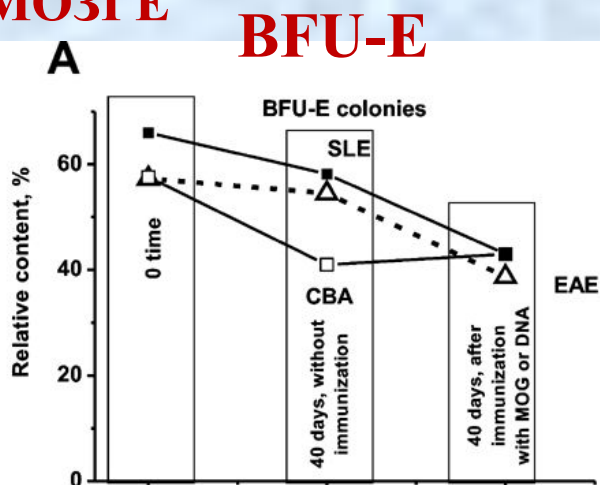


Дифференцировка стволовых клеток костного мозга с образованием разных предшественников клеток крови до и после иммунизации ЕАЕ мышей с помощью MOG



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