

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

*НА ПРАВАХ РУКОПИСИ*

Ермаков Евгений Александрович

**ПРИРОДНЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ  
ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА G ПРИ  
ШИЗОФРЕНИИ**

03.01.04 – БИОХИМИЯ

**ДИССЕРТАЦИЯ**

НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Бунева В.Н.,  
кандидат медицинских наук, Смирнова Л.П.

НОВОСИБИРСК – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Биологические основы шизофрении.....	12
1.1.1. Нейротрансмиттерные нарушения.....	13
1.1.2. Генетические и эпигенетические факторы развития шизофрении.....	15
1.1.3. Изменения микроРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов при шизофрении.....	18
1.1.4. Патология развития центральной нервной системы и нейродегенерация при шизофрении.....	22
1.1.5. Роль оксидативного стресса в развитии шизофрении.....	24
1.1.6. Иммунологические нарушения при шизофрении .....	26
1.2. Каталитические антитела – абзимы .....	28
1.2.1. Механизмы образования каталитических антител.....	29
1.2.2. Абзимы при различных заболеваниях .....	35
1.2.3. Абзимы при заболеваниях центральной нервной системы .....	44
1.2.4. Биологическая роль абзимов и перспективы их применения в медицине и биотехнологии.....	45
1.3. Заключение по обзору литературы .....	50
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	51
2.1. Пациенты и биологический материал .....	51
2.2. Материалы и оборудование .....	53
2.2.1. Ферменты, субстраты и ингибиторы .....	54
2.3. Методы исследования .....	56
2.3.1. Выделение иммуноглобулинов G из сыворотки крови.....	56
2.3.2. Определение концентрации IgG спектрофотометрическим методом .....	56
2.3.3. MALDI масс-спектрометрический анализ антител .....	56
2.3.4. Доказательства принадлежности каталитической активности иммуноглобулинам.....	57
2.3.4.1. Электрофоретический анализ гомогенности IgG.....	57
2.3.4.2. Гель-фильтрация IgG в кислых условиях .....	57
2.3.4.3. Определение каталитической активности <i>in-situ</i> в геле.....	58
2.4. Методы исследования окислительно-восстановительных активностей антител.....	59
2.4.1. Определение пероксидазной и оксидоредуктазной активностей IgG .....	59

2.4.2.	Определение каталазной активности IgG.....	59
2.5.	Методы исследования гидролитических активностей антител .....	61
2.5.1.	Определение олигосахарид-гидролизующей активности антител .....	61
2.5.2.	Определение АТФ-гидролизующей активности IgG .....	61
2.5.3.	Определение ДНК-гидролизующей активности антител .....	61
2.5.4.	Определение РНК-гидролизующей активности антител.....	62
2.5.5.	Определение микроРНК-гидролизующей активности антител .....	63
2.5.6.	Определение протеолитической активности IgG в реакции гидролиза гистонов .....	65
2.5.7.	Ингибирование протеолитической активности IgG под действием $\alpha$ 1-антитрипсина и апротинина.....	66
2.6.	Статистический анализ полученных данных.....	66
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	68
3.1.	Выделение IgG больных шизофренией и здоровых доноров из сыворотки крови...68	
3.2.	MALDI масс-спектрометрический анализ антител больных шизофренией.....	69
3.3.	Анализ разнообразия каталитических активностей IgG при шизофрении.....	73
3.3.1.	Исследование окислительно-восстановительных активностей IgG .....	74
3.3.1.1.	Пероксидазная и оксидоредуктазная активности антител.....	74
3.3.1.2.	Каталазная активность IgG.....	79
3.3.2.	Исследование гидролитических активностей IgG при шизофрении.....	93
3.3.2.1.	Олигосахарид-гидролизующая активность антител.....	93
3.3.2.2.	АТФ-гидролизующая активность антител .....	94
3.3.2.3.	ДНК-гидролизующая активность IgG.....	95
3.3.2.4.	РНК-гидролизующая активность антител .....	102
3.3.2.5.	Гидролиз микроРНК антителами больных шизофренией .....	108
3.3.2.6.	Гидролиз гистонов антителами больных шизофренией.....	118
3.3.2.7.	Ингибирование протеолитической активности IgG $\alpha$ 1-антитрипсином и апротинином.....	132
4.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	137
5.	ВЫВОДЫ .....	139
6.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	141

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- сСМР – циклический цитидинмонофосфат
- CDR – (Complementarity-determining region) фрагмент вариабельного участка антитела, определяющий комплементарность антигену
- DAMPs – (Damage-associated molecular patterns) молекулярные фрагменты, связанные с повреждением
- DAOA – активатор оксидазы D-аминокислот
- Dgcr8 – белок, кодируемый геном DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8)
- Dicer – рибонуклеаза III, кодируемая геном DICER1
- DISC1 – (Disrupted In Schizophrenia 1) ген нарушенный при шизофрении-1
- Drosha – рибонуклеаза III класса II, кодируемая геном DROSHA
- dsДНК – двуцепочечная (нативная) ДНК
- EGF – (epidermal growth factor) эпидермальный фактор роста
- EGFR – рецептор фактора роста эпидермиса
- ERBB4 – ген рецепторной тирозиновой протеинкиназы ErbB-4
- F<sub>ab</sub> – (fragment antigen binding) участок связывания антигена иммуноглобулином
- F<sub>c</sub> – (fragment crystallizable region) кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина
- FITC – флюоресцеинизотиоцианат
- GAD67 – глутаматдекарбоксилаза
- GSH – восстановленный глутатион
- GSSG – окисленный глутатион
- GWAS – (genome-wide association study) исследование полногеномной ассоциации
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – пероксид водорода
- IVIg – иммуноглобулины для внутривенного введения
- MALDI MS – масс-спектрометрия с матрично-активируемой лазерной десорбцией/ионизацией
- MHC – главный комплекс гистосовместимости
- MS/MS – тандемная масс-спектрометрия
- NAA – N-ацетиласпартат
- NAAG – N-ацетиласпартилглутамат
- NADPH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- NETs – внеклеточные ловушки нейтрофилов (neutrophil extracellular traps)
- NF-κB – фактор транскрипции (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NGS – (next generation sequencing) методы секвенирования нового поколения

NMDA – N-метил-D-аспартат

Nrg1 – нейрегулин-1

PANSS – (Positive and Negative Syndrome Scale) шкала позитивных и негативных синдромов

PMSF – фенилметилсульфонил фторид

poly (A) – полиадениловая кислота

poly (C) – полицитидиловая кислота

poly (U) – полиуридиловая кислота

polyI:C – полирибоинозин-полирибоцитидиловая кислота

PVDF – поливинилдендифторид

RISC – РНК-индуцированный комплекс выключения гена (RNA-induced silencing complex)

SDS – додецилсульфат натрия

SDS PAGE – полиакриламидный гель-электрофорез в присутствии SDS

SNP – (single nucleotide polymorphism) однонуклеотидный полиморфизм

ssДНК – одноцепочечная (денатурированная) ДНК

T<sub>50</sub> – температура полумаксимального ингибирования

Th1 и Th2 – Т-хелперы 1 и 2 типа соответственно

TLR – (Toll-like receptor) Toll-подобный рецептор

Tris – трис-гидроксиметил-аминометан

Хро5 – экспортин-5

ZNF804A – (zinc finger protein 804A) ген, кодирующий цинк-пальцевый белок 804A

АИЗ – аутоиммунные заболевания

АКМ – активированные кислородные метаболиты

АОС – антиоксидантная система

АТ - антитела

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВИП – вазоактивный интестинальный пептид

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГАМК - γ-аминомасляная кислота

ДАБ – 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид

ДЛПФК – дорсолатеральная префронтальная кора

ДТТ – дитиотреитол

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИФА – иммуноферментный анализ

КТ – компьютерная томография  
мРНК – матричная РНК  
МРТ – магнитно-резонансная томография  
ОБМ – основной белок миелина  
ПААГ – полиакриамидный гель  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СКВ – системная красная волчанка  
СМЖ – спинномозговая жидкость  
СОД – супероксиддисмутаза  
ТБК – тиобарбитуровая кислота  
ЦНС – центральная нервная система  
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксовая кислота динатриевая соль

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Шизофрения – это тяжелое психическое расстройство, от которого страдают более 20 миллионов человек во всем мире [1]. Число пациентов с шизофренией во всем мире сопоставимо, например, с числом людей с болезнью Альцгеймера [2], а также примерно в 10 раз больше числа больных рассеянным склерозом [3]. Шизофрения занимала 12-е место среди 310 заболеваний и травм во всем мире по показателю глобального бремени болезней в 2016 г. [4]. Это заболевание сочетает в себе комбинацию таких симптомов как, галлюцинации, бред, расстройства мышления и поведения, которые ухудшают качество жизни пациентов и могут приводить к инвалидности. Несмотря на более чем столетнюю историю изучения шизофрении, общая картина патогенеза этого заболевания далека от полного понимания.

Известно, что в основе характерных клинических проявлений шизофрении лежит дисрегуляция нейромедиаторных систем мозга [5]. При шизофрении обнаружены изменения практически во всех системах нейромедаторов, в том числе дофамина, глутамата, серотонина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты [6, 7, 8, 9]. Согласно современным представлениям шизофрения относится к мультифакториальным заболеваниям. Считается, что к нейромедиаторным нарушениям могут приводить различные факторы окружающей среды и генетическая предрасположенность [10]. Предполагается, что эти факторы способствуют нарушению регуляции экспрессии генов, а также процессов нейронального развития [11]. В реализации генетической уязвимости при шизофрении также могут участвовать оксидативные нарушения и дисфункция митохондрий [12]. Однако в последнее время все большее число исследований сосредоточено на роли иммунных изменений в патогенезе шизофрении, появляется все больше доказательств о связи воспаления с развитием этого заболевания [13, 14, 15, 16]. Обнаруженные нарушения затрагивают практически все звенья иммунитета [17], тем не менее, роль гуморального иммунитета при шизофрении изучена недостаточно.

Исследования гуморальной иммунной системы при шизофрении в основном сосредоточены на поиске антител к различным антигенам [18, 19]. У больных обнаружены аутоантитела к антигенам головного мозга, в том числе к различным рецепторам, антиядерные антитела, в том числе против ДНК и гистонов, а также IgG к различным вирусным и бактериальным антигенам [18, 19]. Однако детального исследования свойств образующихся при шизофрении иммуноглобулинов не проведено.

Имуноглобулины являются главными эффекторными молекулами гуморальной иммунной системы. Иммуноглобулины участвуют во многих молекулярных механизмах

как врожденной, так и адаптивной иммунной системы благодаря наличию двух функциональных центров (двух антигенсвязывающих сайтов ( $F_{ab}$ ) и кристаллизующегося фрагмента иммуноглобулина ( $F_c$ )), а также комбинации их уникальных структурных и функциональных свойств. Согласно классическим представлениям иммуноглобулины сочетают опосредованный  $F_{ab}$ -доменом процесс распознавания антигена с активацией различных врожденных ответов, опосредованных участием различных рецепторов, защитных белков и иммунных клеток посредством  $F_c$ -домена [20]. Долгое время считалось, что иммунная система хозяина вырабатывает только высокоспецифичные антитела против различных внешних патогенов [21]. Однако было обнаружено, что в сыворотке здоровых людей присутствует широкий спектр антител, распознающих, в том числе, аутоантигены собственного организма [22]. Благодаря своей полиреактивности и низкой аффинности, такие антитела служат для нейтрализации широкого спектра антигенов, как внешнего, так и внутреннего происхождения, и называются природными или естественными иммуноглобулинами (от англ. «natural antibodies») [23].

С развитием исследовательских технологий и благодаря применению сложных модельных систем в последние годы открыт ряд новых неканонических функций антител [24]. Такие функции включают в себя либо нетипичные стратегии нейтрализации патогенов, либо проявление свойств, характерных для других белков (например, цитокинов или ферментов). Каталитическая активность иммуноглобулинов – это один из наиболее распространенных примеров неканонических функций антител различных классов. Каталитическая активность обусловлена тем, что некоторые фракции иммуноглобулинов способны не только связывать антиген, но и каталитически его модифицировать [25]. Описано множество реакций, катализируемых антителами [26], но наиболее часто встречающимися и наиболее изученными являются окислительно-восстановительные и гидролитические. Образование каталитических антител, или абзимов, связано с активацией иммунной системы и аутоиммунными реакциями. При аутоиммунных заболеваниях, например, таких как системная красная волчанка и рассеянный склероз обнаружены каталитические антитела, гидролизующие белки, ДНК, РНК, полисахариды [27]. Среди природных каталитических антител наиболее полно изучены иммуноглобулины класса G ( $IgG$ ), поскольку они обладают наибольшим спектром активности, а также широко представлены в кровотоке. При различных аутоиммунных и инфекционных заболеваниях каталитические антитела могут быть чрезвычайно гетерогенными как по субстратной специфичности, так и по уровню каталитической активности и патогенетическим эффектам. Поэтому особенно важно изучать весь спектр каталитических активностей антител при конкретном заболевании,



чтобы выяснить их роль при данной патологии. Учитывая вовлеченность иммунологических нарушений в патогенезе шизофрении [17, 18], исследование дисфункции гуморальной иммунной системы, связанной с генерацией каталитических антител при данном заболевании является актуальной научной задачей, имеющей важные трансляционные перспективы.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы заключалась в изучении разнообразия каталитических активностей и ферментативных свойств иммуноглобулинов класса G при шизофрении. В ходе работы планировалось решить следующие задачи:

1. Получить гомогенные препараты IgG больных шизофренией и здоровых доноров; доказать, что исследуемые препараты антител обладают каталитическими активностями; сопоставить уровни активностей IgG пациентов и здоровых доноров; сравнить ферментативные свойства (pH- и металло-зависимость, специфичность, сродство к субстрату, кинетические параметры) изучаемых каталитических IgG с известными свойствами канонических ферментов с аналогичной каталитической активностью.
2. Исследовать окислительно-восстановительные активности препаратов IgG: пероксидазную, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимую оксидоредуктазную и каталазную.
3. Изучить гидролитические активности препаратов IgG в реакциях гидролиза олигосахарида, АТФ, ДНК, РНК и микроРНК, а также гистонов.
4. Провести поиск природных ингибиторов IgG с протеолитической активностью.

#### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

В работе впервые изучено разнообразие каталитических активностей IgG больных шизофренией. Показано, что IgG пациентов обладают пероксидазной, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимой оксидоредуктазной и каталазной активностью, что может указывать на роль каталитических антител в регуляции окислительно-восстановительного баланса в организме. Обнаружена способность каталитических антител больных шизофренией гидролизовать ДНК, РНК и гистоны. Кроме того, впервые обнаруженная способность α1-антитрипсина и апротинина ингибировать протеолитическую активность антител указывает на то, что активность системы каталитических антител в организме тонко регулируется специфическими природными ингибиторами.

Полученные данные создают основу для разработки критериев стратификации больных шизофренией на основе иммунных показателей. Это позволит персонально рекомендовать применение противовоспалительной терапии у больных с выраженными

иммунологическими нарушениями. Данный подход позволит скорректировать лечение пациента с учётом патогенетических особенностей заболевания и увеличить эффективность проводимой терапии.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. IgG больных шизофренией проявляют широкий спектр каталитических активностей, которые являются собственным свойством антител. IgG пациентов с шизофренией обладают более высокой каталитической активностью по сравнению со здоровыми донорами. Биохимические свойства каталитических антител значительно отличаются от свойств канонических ферментов с аналогичной каталитической активностью. Сродство к субстрату всех исследуемых абзимов выше на 2–4 порядка, по сравнению с каноническими ферментами.
2. IgG больных шизофренией проявляют *in vitro* пероксидазную, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимую оксидоредуктазную и каталазную активности.
3. IgG пациентов с шизофренией обладают ДНК-, РНК- и гистон-гидролизующими активностями. IgG гидролизуют ДНК, микроРНК и гистоны с сопоставимой эффективностью, что подтверждается результатами корреляционного анализа. Уровни микроРНК- и гистон-гидролизующей активности коррелируют с клиническими особенностями шизофрении.
4. Гистон-гидролизующая активность IgG в присутствии сывороточных ингибиторов сериновых протеаз  $\alpha$ 1-антитрипсина и апротинина снижается пропорционально их концентрации.

#### **Публикации и опробация работы.**

По результатам работы опубликовано 8 публикаций, среди которых 6 статей, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, 1 статья, индексируемая в РИНЦ, а также глава в коллективной монографии. Основные результаты работы представлены на 20-ти российских и международных конференциях, в том числе: 27<sup>th</sup> ECNP Congress (Берлин, Германия, 2014), VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), 29<sup>th</sup> ECNP Congress (Вена, Австрия, 2016), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Москва, Россия, 2016), 30<sup>th</sup> ECNP Congress (Париж, Франция, 2017), XX Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, Россия, 2017), Семинар Европейской коллегии по нейропсихофармакологии для молодых ученых в Европе (Ницца, Франция, 2018),

Конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, Россия, 2018), 18<sup>th</sup> FEBS Young Scientists' Forum и 34<sup>rd</sup> FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018), 31<sup>st</sup> ECNP Congress (Барселона, Испания, 2018), VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio-2019 (Новосибирск, Россия, 2019), IV Объединенный иммунологический форум – 2019 (Новосибирск, Россия, 2019), 19<sup>th</sup> WPA World Congress of Psychiatry (Лиссабон, Португалия, 2019), BGRS/SB-2020: 12<sup>th</sup> International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology” (Новосибирск, Россия, 2020).

### **Структура и объем работы.**

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 172 страницах, содержит 36 рисунков, 11 таблиц и приложение, включающее 6 рисунков и 2 таблицы. Список цитированной литературы содержит 442 источника.

### **Вклад автора.**

Основная часть результатов, представленных в диссертации, получены автором лично. MALDI-масс-спектрометрический анализ препаратов антител проведен в ТИБОХ ДВО РАН с участием проф. Невинского Г.А. и к. б. н. Дмитренко П.С. Автор выражает благодарность Воробьевой М.А. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН) за помощь в подборе условий регистрации продуктов гидролиза микроРНК.

# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Биологические основы шизофрении

Шизофрения – это хроническое полиморфное психическое расстройство мультифакториальной природы, затрагивающее до 1% человеческой популяции, характеризующееся нарушением процессов мышления, восприятия, эмоциональных реакций и поведения [28]. В мире насчитывается около 26 млн пациентов, страдающих шизофренией [29]. Это заболевание часто развивается в молодом возрасте (20 – 25 лет), приводя к инвалидности и потери трудоспособности. Из-за хронического характера шизофрения влияет на качество жизни и входит в число десяти основных причин инвалидности во всем мире [29]. Высокими экономическими издержками [30], а также тяжестью социальных последствий обусловлена актуальность изучения биологических основ шизофрении. Это заболевание характеризуется глубокими расстройствами мышления, восприятия и эмоциональных реакций. Шизофрения может проявляться в виде галлюцинаций, бредовых идей, паранойи, а также сопровождаться трудностями с концентрацией внимания, аффективными и когнитивными нарушениями и социальной дезадаптацией [31]. Ведущие симптомы шизофрении делятся на позитивные, к которым относятся галлюцинации, бред, дезорганизация мышления, а также на негативные, включающие снижение аффективных реакций, ангедонию, апатию, абулию и другие проявления [31].

Несмотря на более чем столетнюю историю изучения шизофрении детальные механизмы патогенеза этого психического расстройства остаются неизвестными. Согласно современным представлениям шизофрения относится к мультифакториальным заболеваниям, в патогенезе которых участвуют наследственные и средовые факторы. Факторы окружающей среды, связанные с более высокой вероятностью развития шизофрении, включают в себя перинатальные осложнения, алиментарную недостаточность, употребление психоактивных веществ, урбанизацию населения и другие. Различные генетические исследования показали, что шизофрения имеет выраженный наследственный компонент (глава 1.1.2). Обнаружена ассоциация шизофрении с генами нейромедиаторных систем, генами, участвующими в регуляции нейронального развития, а также с генами иммунной и антиоксидантной систем. Развитие шизофрении также связывается с нарушением регуляции экспрессии генов посредством микроРНК (глава 1.1.3). Нарушение экспрессии генов во время внутриутробного периода могут приводить к патологии развития нервной системы и впоследствии к шизофрении

(глава 1.1.4). В реализации генетической уязвимости при шизофрении могут участвовать оксидативные нарушения (глава 1.1.5). Имеется множество доказательств окислительно-восстановительного дисбаланса и митохондриальной дисфункции при шизофрении. Оксидативный стресс тесно связан с воспалением, аномалиями миелинизации и нейротрансмиттерными нарушениями, обнаруженными при шизофрении. Факторы окружающей среды могут вносить вклад в патогенез шизофрении посредством иммунологических механизмов (глава 1.1.6). Показано, что внутриутробные инфекции увеличивают риск развития шизофрении, кроме того обнаружены нарушения практически всех звеньев иммунитета у пациентов. Указанные этиопатогенетические факторы приводят к развитию нейротрансмиттерных нарушений в центральной нервной системе (ЦНС) (глава 1.1.1), в результате которых возникают специфические симптомы заболевания.

### 1.1.1. Нейротрансмиттерные нарушения

В основе патогенеза шизофрении лежат различные нейротрансмиттерные нарушения. Вне зависимости от первоначальных этиологических факторов, все они в конечном итоге приводят к патологии нейротрансмиттерной передачи, вследствие которой развиваются характерные симптомы шизофрении. Дофаминовая гипотеза является самой старой нейрохимической теорией патофизиологии шизофрении [32]. Это обусловлено, во-первых, тем, что первыми препаратами, показавшими свою эффективность в лечении шизофрении, оказались блокаторы D<sub>2</sub>-дофаминовых рецепторов. Во-вторых, препараты, стимулирующие высвобождение дофамина, или усиление передачи дофамина, такие как амфетамин и 3,4-дигидроксифенилаланин (L-DOPA), усугубляют психоз у пациентов с шизофренией и могут вызывать характерные симптомы шизофрении у здоровых людей [33].

Согласно современным представлениям, в основе патогенеза шизофрении лежит дисбаланс между корковыми и подкорковыми структурами головного мозга. В частности, чрезмерная стимуляция D<sub>2</sub>-дофаминовых рецепторов в мезолимбическом пути ведет к развитию позитивных симптомов заболевания [32]. В то же время сниженная активность в мезокортикальном пути приводит к появлению негативных симптомов [34]. Важно отметить, что мезокортикальный путь оказывает тормозящее действие на мезолимбический путь, а основным нейромедиатором в этих путях является дофамин. Вовлеченность дофаминергической системы в патогенез шизофрении доказывается результатами нейровизуализационных исследований (фМРТ, ПЭТ), в которых показано

увеличение концентрации дофамина и способности к его высвобождению в полосатом теле, а также уменьшение высвобождения дофамина в дорсолатеральной области префронтальной коры (ДЛПФК) [35]. Помимо этого, обнаружена тесная ассоциация с генами дофаминэргической системы при шизофрении (более подробно в главе 1.1.2). Однако в целом литературные данные противоречивы, и нарушениями только в системе дофамина нельзя объяснить все наблюдаемые аномалии.

Гипердофаминэргическое состояние может быть следствием гипофункции NMDA-рецепторов глутамата [36]. В лабораторных экспериментах показано, что антагонисты NMDA-рецепторов, такие как кетамин и фенциклидин, вызывают характерные симптомы шизофрении, причем, они воспроизводят как негативные, так и позитивные симптомы, а также симптомы когнитивного дефицита и специфическую картину повреждения нейронов [37]. Кроме того, многие из генов, которые были идентифицированы как гены риска для шизофрении (например, GAD67, DAOA, NRG1), кодируют белки, участвующие в глутаматэргической нейротрансмиссии (более подробно в главе 1.1.2). Причиной гипофункции NMDA-рецепторов при шизофрении, могут являться как снижение концентраций коагонистов рецептора (глицина и D-серина), так и повышение уровней эндогенных антагонистов (NAAG и кинуреновой кислоты) [36]. Как известно, дипептид N-ацетиласпартилглутамат (NAAG) является третьим по распространенности нейромедиатором после глутамата и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в нервной системе млекопитающих. Показано, что NAAG является высокоселективным агонистом пресинаптического метаботропного глутаматного рецептора 3-го типа (mGluR3) и может ингибировать высвобождение глутамата, но в тоже время при низких концентрациях, NAAG может выступать антагонистом NMDA-рецептора и способствовать высвобождению глутамата [38, 39]. Снижение синтеза NAAG или повышенный распад может способствовать дисфункции NMDA-рецептора. Поэтому ингибирование глутамат карбоксипептидазы, фермента, гидролизующего NAAG, может рассматриваться, как одно из возможных направлений лечения шизофрении [39].

Важную роль в модуляции активности NMDA-рецепторов в коре головного мозга играют тормозные интернейроны, экспрессирующие кальцийсвязывающие белки парвальбумин, кальретинин и кальбиндин [37, 40]. Основным нейромедиатором в этих интернейронах является тормозный нейромедиатор ГАМК. Посмертные исследования мозговой ткани больных шизофренией показали снижение кортикальной концентрации ГАМК, а также активности глутаматдекарбоксилазы и глутаминсинтетазы, ферментов, участвующих в синтезе ГАМК [36, 41]. Интересно, что у больных шизофренией выявлен глубокий дефицит парвальбумин-экспрессирующих интернейронов в гиппокампе, а также

в ДЛПФК, что приводит к дисфункции этих областей мозга и нарушению координации различных отделов [37, 42]. Таким образом, на клеточном уровне при шизофрении наблюдается снижение активности ГАМК-ергических тормозных интернейронов, что приводит к нарушению возбудимости NMDA-рецепторов и гипердофаминергическому состоянию. Недостаточное регулирование активности различных отделов мозга, вследствие дисфункции тормозных парвальбумин-экспрессирующих интернейронов может являться важным звеном патогенеза шизофрении [37].

На поверхности интернейронов также имеются  $\alpha 7$ -никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, активация которых приводит к деполяризации мембраны интернейрона, что способствует высвобождению ГАМК. Никотин, который действует на эти рецепторы, может усиливать возбуждение интернейронов и тем самым стабилизировать их работу [36]. Этим объясняется более высокая распространенность курения среди больных шизофренией, которая составляет более 70%, что в 2-4 раза выше, чем у населения в целом [36]. Благодаря курению уменьшаются когнитивные нарушения у таких больных. Таким образом, ацетилхолинергическая нейромедиаторная система также может быть вовлечена в патогенез шизофрении.

Ряд посмертных, нейровизуализационных и фармакологических исследований, проведенных за последнее десятилетие, указывает на серотонинергическую дисфункцию в мозге пациентов с шизофренией [43]. Показано снижение плотности транспортера серотонина в коре головного мозга, а также увеличение плотности 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов и снижение 5-HT<sub>2</sub> рецепторов в различных областях мозга [43]. Но более очевидным доказательством участия серотониновой системы в патогенезе шизофрении является высокая эффективность атипичных антипсихотиков, действующих не только на дофаминовые, но и на серотониновые рецепторы [44].

Таким образом, при шизофрении нарушения затрагивают почти все нейромедиаторные системы. Несмотря на длительный период изучения шизофрении, общая картина патогенеза нейромедиаторных нарушений еще далека от полного понимания. К патологии нейротрансмиттерной передачи при шизофрении могут приводить различные этиологические факторы, в том числе и генетические.

### 1.1.2. Генетические и эпигенетические факторы развития шизофрении

Шизофрения имеет выраженный генетический компонент [45]. Риск заболеть примерно одинаков для мужчин и женщин и повышается с увеличением степени родства с

большим [45]. Так приблизительные риски для родственников первой линии составляют 6% для родителей, 9% для братьев и сестер, 13% для потомства с одним родителем-шизофреником и 46% для потомства с двумя родителями-шизофрениками [46]. Согласно близнецовым генетическим исследованиям последних лет коэффициент наследуемости шизофрении составляет приблизительно 40 %. В работе Hilker R. et al. для датской популяции показано, что конкордантность для монозиготных близнецов составляет 33% и 7% для дизиготных близнецов [47]. Это значит, что развитие шизофрении на 70–80% определяется генетическими факторами и лишь 20–30% приходится на другие этиологические факторы. На развитие шизофрении могут также влиять экологические факторы, урбанизация, миграция населения, низкий социальный статус, пренатальные инфекции матери (подробнее в главе 1.1.6), употребление психоактивных веществ и другие факторы [45].

Полное картирование генома человека позволило детально оценить связь специфических хромосомных сегментов с развитием шизофрении. По результатам анализа сцепления идентифицированы ряд локусов, расположенных на 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 20 и 22 хромосомах, ассоциированных с развитием шизофрении [45]. Однако этот метод не позволяет точно идентифицировать гены восприимчивости к шизофрении.

Для оценки взаимосвязи между конкретными вариантами генов и риском развития шизофрении используются методы исследования генетической ассоциации. Анализ вариаций числа копий (Copy number variation, CNV) генов позволил выявить ряд ассоциаций с делециями или дупликациями, локализованными на хромосомах 1q21.1, 2p16.3, 15q13.3, 22q11.2 [48]. В частности, изменение числа копий затрагивало гены таких белков, как нейрексин 1, белок рецептора эпидермального фактора роста ERBB4, нейрегулин 1, белок  $\alpha$ -7 никотиновых рецепторов и др. В широкомасштабном исследовании CNV в масштабе всего генома, выявлено, что частота встречаемости CNV у больных шизофренией в 1,15 раза выше, чем в контрольной группе [49]. В этом исследовании также обнаружены ассоциации больших делеций на хромосомах 1, 15 и 22 с развитием шизофрении [49]. На небольших выборках больных обнаружены ассоциации с генами антиоксидантной системы [50]. Однако более интересные данные получены при исследовании полногеномной ассоциации (genome-wide association study, GWAS) однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphism, SNP).

К настоящему времени проведено несколько крупных GWAS-исследований при шизофрении [51, 52, 53, 54]. В работе 2009 г. для европейской популяции показана выраженная ассоциация с 450-ю генами главного комплекса гистосовместимости (major



histocompatibility complex, MHC), расположенными на 6 хромосоме, а также с первым интроном гена миозина XVIIIВ (MYO18B) на 22 хромосоме [51]. В 2011 г. на большей выборке пациентов обнаружена выраженная ассоциация с интронной областью гена первичного транскрипта для microRNA-137 (miR-137), которая играет важную роль в развитии нейронов (подробнее в главе 1.1.3) [52]. Примечательно, что также обнаружена ассоциация с рядом генов, экспрессия которых контролируется miR-137, что может указывать на miR-137-опосредованную дисрегуляцию при шизофрении. В работе 2013 г. в результате многоступенчатого GWAS-исследования идентифицировано 13 новых локусов, ассоциированных с шизофренией [53]. Помимо этого, обнаружена ассоциация с рядом генов кальциевых каналов, что может указывать на участие кальциевой сигнальной системы в патогенезе шизофрении. Также показана ассоциация с генами длинных некодирующих РНК (long noncoding RNAs, lincRNAs), регулирующих множество процессов в организме. В 2014 г. в результате еще более крупного многоступенчатого GWAS-исследования, в котором проанализировано 9,5 млн. SNP, на выборке из 37 тыс. больных и 113 тыс. здоровых доноров идентифицировано 128 независимых ассоциаций, охватывающих 108 локусов [54]. В исследовании 2016 г. детально проанализирована ассоциация SNP с генами MHC и обнаружена ассоциация с генами компонента комплемента 4 (C4A и C4B) [55].

Однако самым важным результатом из всех приведенных выше исследований является доказательство полигенной природы шизофрении. Обнаружена ассоциация с множеством генов, каждый из которых может вносить незначительный вклад в патогенез заболевания. Только комбинация множества генов приводит к развитию заболевания. По предварительной оценке комбинация 6 300 – 10 200 отдельных SNP могут способствовать развитию шизофрении [53]. Помимо этого, многие обнаруженные ассоциации также связаны с другими психическими заболеваниями. Кроме того, с помощью полногеномного анализа сложных признаков (Genome-wide Complex Trait Analysis) на основе анализа ассоциаций SNP получен гораздо меньший коэффициент наследуемости – 0,23 – 0,32 [53]. Тем не менее, очевидно, что генетические факторы, в том числе SNP вносят существенный вклад в риск развития шизофрении.

Можно выделить ряд наиболее важных генетических ассоциаций, теоретически связанных с развитием заболевания. Во-первых, показана ассоциация с генами дофаминергической и глутаматергической системы (DRD2, GAD67, DAOA/G72, GRM3, DTNPI, GAD1 и др.), что подтверждает предложенные ранее гипотезы вовлеченности в патогенез этих систем (подробнее глава 1.1.1) [53, 54]. Во-вторых, обнаружена ассоциация с генами MHC (HLA-DR, компонента комплемента 4) и другими генами иммунной

системы, что указывает на важную роль иммунной системы в патогенезе заболевания (подробнее глава 1.1.6) [51, 53, 55]. В-третьих, ассоциация с геном нейрегулина 1 (NRG1) и другими генами, участвующими в развитии нервной системы, может свидетельствовать о патологии нейронального развития при шизофрении (подробнее глава 1.1.4) [36, 48]. В-четвертых, ассоциация с генами антиоксидантной системы указывает на вовлеченность оксидативного стресса в патогенез заболевания (подробнее глава 1.1.5) [50]. В-пятых, ассоциация с генами miR-137 и lincRNAs [52, 53] позволяет предположить, что нарушение регуляции экспрессии генов имеет большее значение в этиопатогенезе шизофрении, чем изменения в последовательности белка (подробнее глава 1.1.3), поскольку множество ассоциаций было обнаружено за пределами белок-кодирующих областей генома.

Эпигенетические механизмы могут являться связующим звеном, между факторами окружающей среды и генетическими факторами. При шизофрении обнаружены следующие нарушения эпигенетической регуляции: показано aberrантное метилирование ДНК примерно в 100 локусах, включая гены, регулирующие глутаматергическую и ГАМК-ергическую системы, гены стрессового ответа и гены, регулирующие развитие нервной системы; метилирование различных генов приводит к изменению симптомов заболевания; обнаружено увеличение активности ДНК-метилтрансферазы I в интернейронах гиппокампа и стриатума; в префронтальной коре пациентов обнаружены повышенные уровни донора метильной группы – S-аденозилметионина; повышенный уровень гомоцистеина в сыворотке крови обнаруживается при обострении; обнаружены модификации гистонов, приводящие к нарушению регуляции различных генов [56].

В целом, изучение генетики шизофрении еще до конца не завершено. Вполне возможно, что с увеличением размеров выборки пациентов получится идентифицировать новые комбинации генов, способствующих развитию шизофрении, и построить модель их взаимодействия. Кроме того, секвенирование и анализ ассоциации с некодирующими областями генома может дать новую информацию о патогенетических механизмах, лежащих в основе шизофрении.

### **1.1.3. Изменения микроРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов при шизофрении**

Как указано в предыдущей главе, наличие тесной ассоциации с некодирующими белок областями генома, а также с генами регуляторных РНК, указывает на то, что в этиологии шизофрении нарушения регуляции экспрессии генов играют бóльшую роль, чем изменения в их нуклеотидной последовательности. Результаты исследований

консорциума PsychENCODE с использованием NGS (next generation sequencing) методов указывают на сложные пространственно-временные, половые, клеточно-специфические изменения в экспрессии генов, сплайсинге, уровне изоформ транскрипта в мозге пациентов с шизофренией [57, 58]. Такие изменения могут объясняться нарушениями в микроРНК-опосредованной регуляции [59]. В связи с этим началось активное изучение роли микроРНК в патогенезе шизофрении.

МикроРНК представляют собой большое семейство коротких (около 22 нуклеотидов) некодирующих РНК, которые индивидуально регулируют экспрессию до нескольких сотен генов путем РНК-интерференции [60]. МикроРНК реализуют свою функцию связываясь с комплементарными последовательностями в транскрипте матричной РНК (мРНК). Это, в свою очередь, влияет на биосинтез белка, путем увеличения скорости деградации мРНК, то есть уменьшения времени, в течение которого транслируемая мРНК остается в клетке, либо физически препятствуя трансляции транскрипта рибосомами [59, 60]. Биосинтез и процессинг микроРНК начинается с транскрипции первичного продукта гена при-микроРНК, содержащего последовательность от одного до шести предшественников пре-микроРНК. Обработка в ядре ферментативным комплексом, состоящим из рибонуклеазы III (Drosha) и РНК-связывающего белка Dgcr8, кодируемого геном DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) высвобождает пре-микроРНК, двухцепочечную молекулу РНК, состоящую из зрелой микроРНК, связанной с комплементарной шпилечной цепью. Затем микроРНК экспортируется в цитоплазму с помощью нуклеоцитоплазматического челночного белка экспортин-5 (Хро5). В цитоплазме эндорибонуклеаза Dicer расщепляет петлю шпильки с образованием РНК-дуплекса из двух зрелых микроРНК, позволяя высвобождающейся микроРНК загружаться в мультибелковый комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), который связывается с мРНК-мишенью и ингибирует трансляцию [59, 60]. При этом в комплекс RISC загружается только одна молекула из микроРНК дуплекса. Вторая микроРНК либо деградирует, либо высвобождается из клетки в составе везикул, в частности экзосом. Кроме того, микроРНК могут транспортироваться в составе комплексов с белками (липопротеинами высокой плотности, или РНК-связывающими белками, например белком Argonaute, являющимся частью комплекса RISC) [61]. Таким образом, часть образующихся микроРНК может поступать в кровоток, транспортироваться до клеток-реципиентов и регулировать в них экспрессию целевых генов.

МикроРНК в большей степени экспрессируются в мозге человека, по сравнению с другими органами, что указывает на то, что микроРНК-опосредованная регуляция

экспрессии генов имеет решающее значение для правильного функционирования ЦНС [59]. Сравнение уровней экспрессии микроРНК между эмбриональной и взрослой человеческой тканью, взятой после смерти, показало, что среди измеренных 54-х микроРНК, общий уровень экспрессии микроРНК в ЦНС почти в три раза выше во время пренатального развития [62]. Аналогичным образом анализ экспрессии микроРНК в ДЛПФК, взятый после вскрытия у 97 психически здоровых субъектов различного возраста, показал, что уровни микроРНК были самыми высокими в период раннего детства и значительно снижались в подростковом возрасте после созревания нейронных сетей [63]. Кроме того, было показано, что микроРНК направлены на большое число генов, которые имеют решающее значение для развития нервной системы и нормальной функции мозга [59]. Считается, что в нейронах, микроРНК распадаются очень быстро, и их оборот зависит от активности нейронов [60]. Эти данные подчеркивают значимость микроРНК в регуляции развития и поддержания пластичности нервной системы.

При шизофрении показано нарушение экспрессии микроРНК в плазме и лимфоцитах периферической крови [64, 65]. В исследованиях посмертной ткани мозга обнаружено нарушение экспрессии микроРНК в различных областях лобной и теменной коры [65, 66]. Анализ уровней микроРНК в верхней височной извилине и ДЛПФК с использованием микрочипов показал общую картину разнонаправленных изменений экспрессии микроРНК в ЦНС пациентов с шизофренией. Эти исследования демонстрируют, что экспрессия 21% микроРНК в верхней височной извилине и 9% микроРНК в ДЛПФК увеличивается у пациентов с шизофренией по сравнению со здоровыми донорами [59]. Это указывает на то, что шизофрения связана со значительными нарушениями регуляции транскрипции в мозге, опосредованной микроРНК.

Транскрипция генов микроРНК регулируется аналогично транскрипции генов, кодирующих белок [60]. Нарушение экспрессии микроРНК может быть обусловлено снижением синтеза этой молекулы, вследствие мутаций в генах микроРНК или генах белков, участвующих в синтезе микроРНК (Drosha, Dgcr8, Xpo5, Dicer, Argonaute и др.), либо ускоренной деградацией молекулы микроРНК. Исследования генетической ассоциации сообщают об ассоциациях между SNP в генах DGCR8 (rs3757, rs8139591, rs9606248) и DICER1 (rs3742330, rs11621737) с заболеваемостью шизофренией для китайской группы пациентов [59]. Однако данные для других группах больных противоречивы. В ряде исследований показано снижение соотношения зрелой микроРНК и первичного транскрипта [67], что указывает на нарушение некоторых этапов синтеза либо разрушение зрелой микроРНК или ее предшественников. В посмертных исследованиях обнаружена дисрегуляция экспрессии генов синтеза микроРНК в

различных областях мозга. В 9 районе Бродмана (ДЛПФК) показано увеличение экспрессии мРНК Dgcr8, Drosha и Dicer1, в то время как в 46 районе Бродмана увеличивается экспрессия только гена Dicer1 [59]. Такие региональные отличия в экспрессии генов синтеза микроРНК могут приводить к изменению скорости образования микроРНК в различных областях мозга, что может частично объяснять региональную специфику изменения экспрессии белка при шизофрении.

Следует выделить ряд наиболее важных нейроспецифических микроРНК, экспрессия которых изменяется при шизофрении, а также для которых показана ассоциация с шизофренией. GWAS-исследования ассоциации SNP дали убедительные доказательства участия miR-137 в патогенезе шизофрении [52] (см. главу 1.1.2). Кроме того, обнаружено, что множество идентифицированных в GWAS-исследованиях генов риска развития шизофрении, регулируются непосредственно микроРНК, причем значительная часть из этих генов (497 генов) регулируются miR-9-5p, а часть генов пересекается с генами, регулируемые miR-137 [68]. Показано, что miR-137 играет важную роль в дифференцировке эмбриональных стволовых клеток, нейрогенезе, дендритном морфогенезе, созревании синапсов [69]. Также miR-137 ингибирует AMPA-рецептор-опосредованную синаптическую передачу путем снижения экспрессии субъединицы GluA1 этого рецептора [70]; влияет на выход нейротрансмиттеров из синаптических везикул и регулирует синаптическую пластичность [71]. Первые эксперименты по нокауту гена miR-137 показали, что частичная потеря miR-137 у гетерозиготных мышей приводит к дисрегуляции синаптической пластичности, стереотипному поведению, а также к нарушению обучения и социального поведения [72]. Причем протеомный и транскриптомный анализы показали, что основной мРНК-мишенью miR-137 является фосфодиэстераза 10a, дисфункция которой может быть связана с наблюдаемыми аномалиями [72]. Интересно отметить, что одним из генов, экспрессию которых регулирует miR-137, является ген, кодирующий цинк-пальцевый белок 804A (ZNF804A), который в свою очередь ингибирует экспрессию катехол-О-метилтрансферазы, а также D2 рецептора дофамина [69], что указывает на вовлеченность miR-137 в регуляцию дофаминэргической системы. В регуляции экспрессии D2 рецептора дофамина также участвует miR-9-5p [68]. Известно, что miR-9-5p участвует в нейрональной миграции, а также показано, что экспрессия miR-9-5p у больных шизофренией снижена в нейрональных клетках-предшественниках [73]. В пролиферации и развитии нейрональных стволовых клеток важна еще одна микроРНК - miR-219. Также обнаружено, что miR-219 играет важную роль в дифференцировке олигодендроцитов и процессе миелинизации аксонов нейрональных клеток [74].

Учитывая, что каждая микроРНК потенциально регулирует экспрессию сотен генов-мишеней, а также важную роль микроРНК в регуляции развития мозга, клинические последствия дисфункции этой системы могут быть существенными. Нарушения в микроРНК-регулируемой геновой сети могут частично объяснять наблюдаемые аномалии развития ЦНС (подробнее в главе 1.1.4). В целом, микроРНК могут быть связующим звеном между генетическими нарушениями, структурными аномалиями развития и изменениями нейротрансмиттерной передачи при шизофрении.

#### 1.1.4. Патология развития центральной нервной системы и нейродегенерация при шизофрении

Множество эмпирических данных указывают на нарушение развития ЦНС при шизофрении. У больных обнаружены множественные маркеры мелких врожденных аномалий ЦНС, такие как недоразвитие мозолистого тела, стеноз Сильвиевого канала, гамартомы (узловые образования, связанные с аномалиями тканевого развития) головного мозга и полости прозрачной перегородки [75]. Прижизненные исследования анатомии мозга больных шизофренией с помощью КТ и МРТ указывают на увеличение объема третьего и боковых желудочков мозга, незначительное уменьшение общего объема головного мозга, а также серого и белого вещества [76, 77]. Такие аномалии обнаружены в таких областях мозга, как височная и теменная доли, гиппокамп, мозжечок, мозолистое тело, таламус и других [75, 77]. Первый мета-анализ обнаруженных аномалий коры головного мозга при шизофрении, проведенный рабочей группой ENIGMA (Enhanced Neuro Imaging Genetics through Meta Analysis), показал истончение коры и уменьшение площади поверхности мозга, особенно в лобной и височной областях [78]. Важно отметить, что истончение коры и потеря серого вещества наблюдается уже в подростковом возрасте, особенно в префронтальной и височной коре, также, как и у взрослых больных, что является доводом в пользу непрерывности процесса развития болезни [79].

С появлением метода диффузионной тензорной МРТ стало возможным оценить организацию и когерентность волоконных трактов белого вещества. В результате обнаружено уменьшение фракционной анизотропии в левой лобной и левой височной областях белого вещества, что указывает на нарушение взаимосвязи различных областей мозга [80]. В посмертных исследованиях подтверждены данные о кортикальной атрофии, увеличении желудочков, уменьшении объема миндалины и парагиппокампальной извилины, а также данные о потере клеток и уменьшении объема таламуса [75].

На клеточном уровне обнаружено нарушение взаимного расположения слоев коры, ориентации и кластеризации нейронов, аномальное расположение NADPH-диафороза-положительных клеток в ДЛПФК, гиппокампе, в то время как в мозжечке показано уменьшение размеров клеток Пуркинье [75]. В III слое ДЛПФК отмечено снижение плотности дендритов на пирамидальных клетках [81]. Кроме того, обнаружены ультраструктурные и морфометрические нарушения в олигодендроцитах [82]. В целом, наиболее значимыми гистологическими наблюдениями при шизофрении являются аномалии в расположении слоев клеток, размерах нейронов, арборизации (ветвлении) дендритов, а также в процессах синаптического прунинга (удаления избыточных дендритов и аксонов) и синаптической организации.

На молекулярном уровне по результатам протеомных и транскриптомных исследований обнаружены маркеры нарушений пролиферации и дифференцировки нервных клеток, процессов нейротрансмиттерной передачи, синаптической пластичности, кальциевого гомеостаза, энергетического метаболизма, организации цитоскелета и миелинизации [83, 84]. В клетках мозга с помощью современных NGS-методов показаны изменения профиля экспрессии различных генов, участвующих в процессах развития нервной системы [57], клеточного метаболизма, подвижности клеток, ремоделирования цитоскелета, что может объяснять цитоархитектурные аномалии [85, 86]. Все приведенные выше данные свидетельствуют о ранних аномалиях развития нервной системы, влияющих на миграцию, выживаемость, созревание и функцию нейронов.

Генетические данные также указывают на связь с генами, регулирующими нормальное развитие нервной системы (см. главу 1.1.2). В частности, продукт гена, ассоциированного с шизофренией, DISC1 (Disrupted In Schizophrenia 1) регулирует объем серого вещества гиппокампа, арборизацию дендритов, а также миграцию и созревание нейронов [87]. Два других гена риска, NRG1 и ERBB4 (ген рецепторной тирозиновой протеинкиназы ErbB-4), совместно регулируют пролиферацию, развитие, миграцию нейрональных клеток-предшественников, миелинизацию аксонов и образование синапсов [88]. Nrg1 – это нейротрофический фактор, который содержит домен, подобный домену эпидермального фактора роста (epidermal growth factor (EGF)-подобный домен) и который взаимодействует с рецепторами ErbB4. Nrg1 экспрессируется в нескольких областях мозга взрослого человека и регулирует нейрональную передачу и синаптическую пластичность. ErbB4 экспрессируется на глутаматэргических, ГАМК-эргических синапсах [88]. Нарушения в этой системе могут иметь пагубные последствия для развития и функционирования нервной системы. Примечательно, что в сыворотке крови больных

шизофренией обнаружена сниженная концентрация белка Nrg1, однако механизм подобных изменений не выяснен [89].

На основе имеющихся данных выдвинута гипотеза нарушения нейронального развития при шизофрении [75, 90, 91]. Согласно этой теории, шизофрения является результатом нарушений процессов нейронального развития, которые начинаются задолго до появления клинических симптомов и вызваны сочетанием генетических факторов и факторов окружающей среды. В рамках этой теории также выдвинута двухударная гипотеза (two-hit hypothesis) патогенеза шизофрении [75, 92], в которой предполагается, что генетические факторы и факторы окружающей среды, а также различные внутриутробные инфекции негативно влияют на развитие ЦНС. Эти ранние нарушения вызывают долговременную уязвимость перед «вторым ударом», который затем приводит к развитию шизофрении [92].

Приведенные выше данные о кортикальной атрофии, уменьшении размеров нейронов, снижении плотности дендритов, могут также указывать на наличие нейродегенерации при шизофрении. Прогрессирующие нарушения могут объясняться сниженной экспрессией нейротрофических факторов (например, Nrg1), митохондриальной дисфункцией и оксидативным стрессом (более подробно в главе 1.1.5). Тем не менее, теория нейродегенерации при шизофрении подвергается серьезной критике из-за слабой доказательной базы [93]. Поэтому в настоящее время общепризнанной является теория патологии нейронального развития.

### 1.1.5. Роль оксидативного стресса в развитии шизофрении

Оксидативный стресс является важным механизмом патогенеза шизофрении, который объединяет влияние генетических, иммунологических и средовых факторов. Оксидативный стресс возникает вследствие преобладания прооксидантных процессов и недостаточности работы антиоксидантной системы (АОС) [94]. Повышенная восприимчивость головного мозга к оксидативному стрессу обусловлена высокой скоростью утилизации кислорода, участием свободных радикалов в нейрорегуляции, высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, низким содержанием антиоксидантов и присутствием редокс-активных металлов (Cu и Fe) [95, 96]. Заболеванию может способствовать генетическая предрасположенность. В частности, обнаружена ассоциация шизофрении с полиморфизмами генов синтеза глутатиона, а также генов антиоксидантных ферментов, таких как, глутатион-S-трансфераза, глутатионпероксидаза 1, марганцевая супероксиддисмутаза (СОД),



метионинсульфоредуктаза [50]. Кроме того, известно, что метаболизм нейротрансмиттеров может приводить к образованию свободных радикалов [95]. Показано, что окисление дофамина простагландин-Н-синтазой приводит к образованию перекиси водорода, которая посредством аутоокисления дофамина приводит к выработке активированных кислородных метаболитов (АКМ), таких как дофамин-хиноны и супероксид [97, 98]. Помимо этого, ферментативное окисление биогенных аминов моноаминоксидазой в наружной мембране митохондрий приводит к образованию перекиси водорода [98]. Таким образом, множество факторов способствуют развитию оксидативного стресса в нервной ткани.

Ряд обзорных работ посвящен теме оксидативного и нитрозативного стресса при шизофрении [98, 99, 100, 101]. Обнаруженные доказательства прооксидантных нарушений при шизофрении могут быть объединены в три основные группы: 1) нарушения в неферментативной АОС; 2) дисбаланс в ферментативной АОС; 3) маркеры продуктов реакций свободнорадикального окисления. Нарушения в неферментативной АОС включают в себя снижение в плазме крови концентрации антиоксидантных молекул, таких как витамин С, витамин Е, билирубин, альбумин, тиоредоксин и мочевая кислота [100, 102]. Особо следует отметить снижение концентрации восстановленного глутатиона и повышение концентрации окисленного глутатиона в различных областях мозга [103], плазме [104, 105, 106, 107], эритроцитах [108], спинномозговой жидкости (СМЖ) [109] при различных формах шизофрении и в зависимости от лечения [102]. Обнаружены разнонаправленные изменения в активности ферментов АОС. Показано снижение общей антиоксидантной активности плазмы, а также активности каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и увеличение активности глутатион-редуктазы, и глутатион-S-трансферазы [98, 100, 101, 102, 110, 111]. Однако эти результаты противоречивы и зависят от источника биологического материала, стадии заболевания и проводимого лечения. У больных выявлены различные маркеры продуктов реакций свободнорадикального окисления. Показано увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в частности малонового диальдегида в сыворотке, СМЖ, моче, мембранах эритроцитов и тромбоцитов больных [100, 101, 102]. Кроме того, обнаружено повышение карбонильных производных белков, 4-гидроксиноненаля, изопростанов и других молекул [98, 100, 101, 102]. Все это указывает на преобладание прооксидантных процессов у больных шизофренией.

Прооксидантное состояние в нервной ткани приводит к патологии различными путями. Процессы ПОЛ ведут к изменению текучести мембраны, нарушению

функционирования рецепторов и других белков нейронов, что, в свою очередь, приводит к ухудшению поглощения и высвобождения нейротрансмиттеров [94, 95, 101]. Ряд авторов связывает шизофрению с митохондриальной дисфункцией [98, 112]. Это подтверждают посмертные транскриптомно-протеомные исследования, согласно которым почти половина аномально экспрессируемых белков связана с их митохондриальными функциями и оксидативным стрессом [113]. Митохондриальная дисфункция, дефицит глутатиона, а также гипofункция NMDA рецепторов может способствовать нарушению миелинизации [100, 102]. Известно также, что АКМ приводят к дисфункции олигодендроцитов путем нарушения работы сигнального каскада mTOR-P70S6K [114]. Показано, что прооксидантные нарушения коррелируют с нейроанатомическими нарушениями [115, 116].

Воспаление при шизофрении (см. главу 1.1.6) неразрывно связано с оксидативным стрессом. Многие медиаторы воспаления активируются свободными радикалами, в то время как активированные иммунные клетки, такие как микроглия, генерируют АКМ [95]. Интересно, что фактор комплемента Н связывает продукты окисления липидов [117]. Таким образом, окисление липидов может спровоцировать чрезмерную опосредованную комплементом обрезку синапсов микроглией. Однако некоторые авторы отводят главную роль в патогенезе окислительных нарушений при шизофрении парвальбумин-экспрессирующим интернейронам [118, 119, 120]. Оксидативный стресс приводит к потере этих интернейронов и нарушению высокочастотной нейронной синхронизации, характерной для шизофрении.

Таким образом, при шизофрении оксидативный стресс тесно связан с различными патофизиологическими процессами, такими как воспаление, аномалии миелинизации, митохондриальная дисфункция, гипofункция NMDA рецепторов и гибель тормозных парвальбумин-экспрессирующих интернейронов.

### **1.1.6. Иммунологические нарушения при шизофрении**

Многочисленными исследованиями показана связь нарушений в иммунной системе с развитием шизофрении [121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128]. Обнаруженные доказательства иммунологических нарушений при шизофрении включают в себя, во-первых, дисрегуляцию про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов в крови [129, 130, 131] и СМЖ больных [132]. Несмотря на гетерогенность полученных данных, в целом можно отметить преобладание провоспалительных цитокинов у больных с первичным эпизодом и при обострении заболевания, а также преобладание цитокинов, продуцируемых Т-хелперами 2 типа (Th-2) [129, 130]. Во-вторых, обнаружены нарушения

в клеточном звене, включающие увеличение количества моноцитов [127], снижение количества Т-клеток, но при этом увеличение относительного количества воспалительных Th-1 и Th-17 и супрессивных Т-регуляторных клеток [133]. Эти изменения сопровождаются активацией провоспалительных генов в моноцитах периферической крови [134], а также нарушением экспрессии различных генов в Т-лимфоцитах [135]. В-третьих, ряд авторов указывают на наличие аутоантител, в некоторых подгруппах пациентов [136, 137, 138]. У больных с различными формами психоза показано наличие антител к различным нейроантигенам, в том числе, к ионотропным рецепторам глутамата (NMDA и AMPA), дофаминовым D2- рецепторам, метаботропным ГАМК-рецепторам, потенциал-зависимым калиевым каналам, M1 и M2-холинорецепторам [139, 140, 141]. В-четвертых, показана активация микроглиальных клеток головного мозга, которые являются резидентными макрофагами ЦНС [142, 143]. Кроме того, посмертные исследования доказывают повышенную активность микроглии и увеличение экспрессии провоспалительных генов в ЦНС [144, 145], в том числе и транскрипционного фактора NF-κB [146]. Также показано, что провоспалительные цитокины увеличивают активность индоламин 2,3-диоксигеназы и кинуренин монооксигеназы в триптофан-кинурениновом метаболическом пути, что приводит к накоплению 3-гидроксикинуренина и кинуреновой кислоты, которая является антагонистом NMDA рецепторов [122, 123, 124]. Таким образом, иммунологические нарушения непосредственно влияют на различные нейротрансмиттерные системы.

Влияние активации иммунной системы, особенно во время внутриутробного развития, изучалось на животных моделях [147, 148, 149, 150]. Показано, что пренатальная иммунная активация с помощью липополисахарида (модель бактериальной инфекции) и полирибоинозин-полирибоцитидиловой кислоты (polyI:C, модель вирусной инфекции) приводит к активации микроглии, морфофункциональным изменениям нервных клеток, увеличению числа дофаминергических нейронов, гибели парвальбумин-экспрессирующих интернейронов и предшественников олигодендроцитов, нарушению процессов миелинизации, а также снижению предимпульсного торможения, внимания, рабочей памяти и другим психопатологическим симптомам [147, 148, 149, 150]. Эти данные подтверждаются эпидемиологическими исследованиями на человеческой популяции, согласно которым бактериальная, или вирусная инфекция матери во время беременности, а также воспаление приводят к увеличению риска развития шизофрении у детей [151]. Кроме того показана ассоциация шизофрении с аутоиммунными заболеваниями [152, 153]. Эти данные позволили выдвинуть гипотезу «двойного удара» (two-hit hypothesis) в развитии шизофрении [154, 127], которая упоминалась в главе 1.1.4.

Таким образом, при шизофрении обнаружены изменения практически всех звеньях иммунитета, в том числе и гуморальном иммунитете. Тем не менее, остается малоизученным вопрос, какую роль играют иммунологические расстройства в патогенезе шизофрении. В последнее время появились данные, что патология гуморального иммунитета может сопровождаться образованием каталитических антител. Этому вопросу посвящена следующая глава 1.2.

## **1.2. Каталитические антитела – абзимы**

Каталитически активными антителами, или абзимами, называются иммуноглобулины различных классов, обладающие способностью не только связывать антиген, но и катализировать химические реакции с его участием [155, 156, 157]. Впервые на сходство антител и ферментов, а также механизмов, определяющих их специфичность, указывал Л. Полинг еще в 1946 г. [158]. В связывании субстрата в случае фермента, или антигена в случае антитела, участвуют одинаковые молекулярные механизмы [159, 160]. Высокое сродство антител и ферментов обусловлено специфическими нековалентными гидрофобными, электростатическими и ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, а также образованием водородных связей. Если рассматривать химическую реакцию, катализируемую ферментом, с точки зрения изменения свободной энергии, то реагенты, участвующие в реакции, проходят через промежуточное переходное состояние, в котором энергия системы максимальна [161]. Главной движущей силой ферментативного катализа является увеличение энергии связывания по мере приближения к переходному состоянию реакции. Именно это усиление связывания субстрата является причиной снижения энергии активации химической реакции ( $\Delta G$ ), обеспечиваемого ферментом [162, 163]. Полинг предположил, что активный центр фермента направлен против структуры переходного состояния катализируемой химической реакции, а не против нативной конформации молекулы субстрата [164]. В 1969 г. Б. Дженкс, развивая идеи Полинга, высказал гипотезу о том, что антитела, полученные иммунизацией химически стабильными аналогами переходных состояний, будут катализировать эти реакции, а их активные центры будут содержать структурные мотивы, подобные таковым для ферментов [165]. Однако прошло не одно десятилетие, прежде чем подобные каталитически активные антитела были найдены.

Каталитические антитела принято разделять на природные, образующиеся в живом организме, и искусственные, полученные путем иммунизации стабильными аналогами переходных состояний химических реакций, или другими генно-инженерными методами.

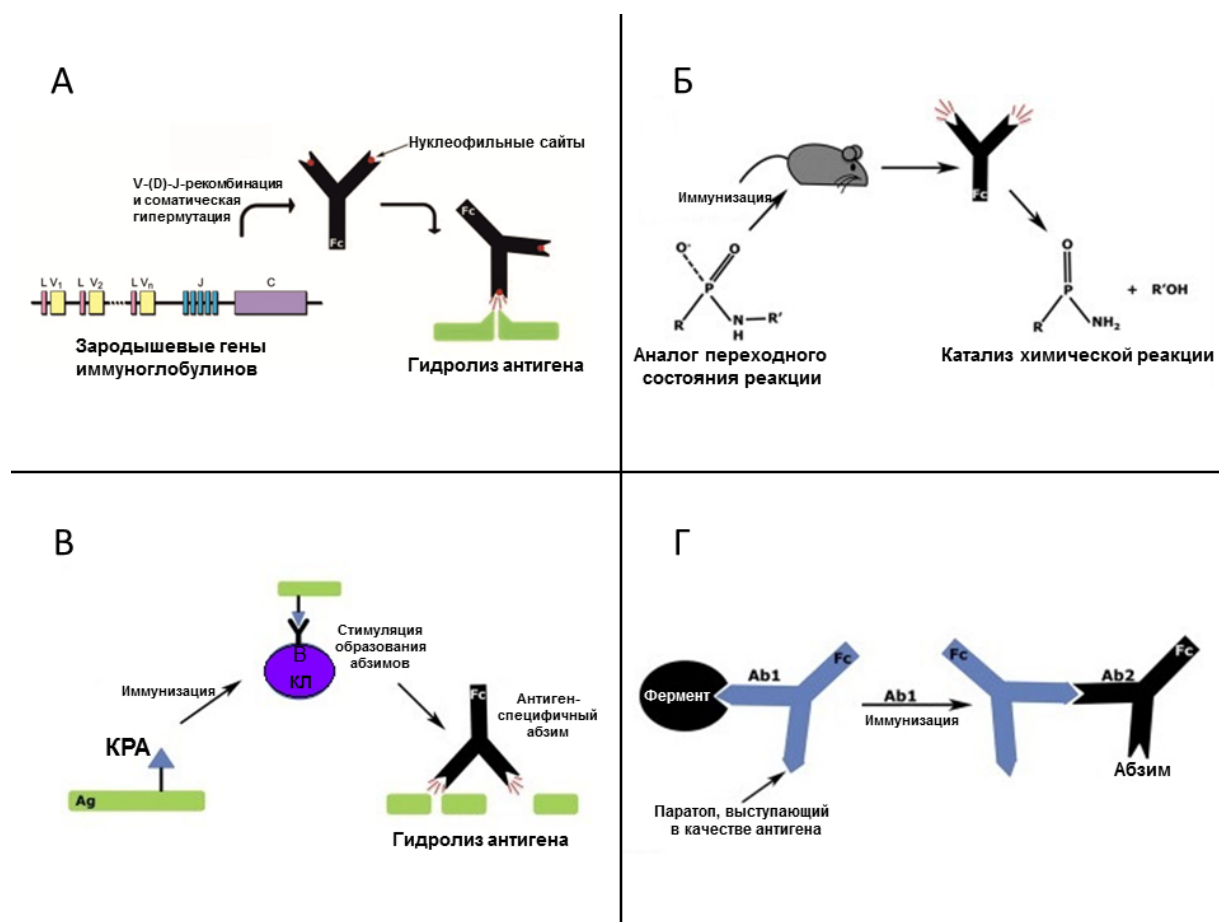
Первые искусственные каталитические антитела получены ранее природных путем иммунизации стабильными аналогами переходного состояния реакции в 1986 г. независимо двумя группами исследователей под руководством П. Шульца [166] и А. Трамонтано [167, 168]. Первым примером природных каталитических антител в мировой литературе принято считать антитела, расщепляющие вазоактивный интестинальный нейропептид (ВИП), выделенные из крови больных бронхиальной астмой в лаборатории под руководством Сидхура Пола (Sudhir Paul) в 1989 г. [169]. Тем не менее, первые упоминания о природных каталитических антителах появились в середине 1960-х. Слобин Л. И. в 1966 г. получил антитела с эстеразной активностью, гидролизующие *p*-нитрофенил ацетат, после иммунизации кроликов конъюгатом *p*-нитрокарбоксивензоксид хлорида с бычьим сывороточным альбумином [170]. А в 1968 г. Кульберг А. Я. с соавт. обнаружили протеолитическую активность в высокоочищенных препаратах антител кролика [171]. Однако в данных работах не было приведено доказательств, что наблюдаемая активность принадлежит непосредственно антителам, а не является следствием загрязнения препаратов совыделяющимися каноническими ферментами.

В настоящее время известно более 100 реакций, катализируемых каталитическими антителами, полученными как иммунизацией различными гаптенами - стабильными аналогами переходного состояния, так и с помощью методов сайт-направленного мутагенеза генов антигенсвязывающего участка, селективной химической модификации активного центра и других подходов [157]. Причем в ряде случаев полученные абзимы обладают более высокой скоростью катализа, чем канонические ферменты, высокой специфичностью (в том числе и стереоспецифичностью), а для некоторых нет аналогов среди природных ферментов. Поэтому интерес в изучении каталитических антител связан с перспективами применения их в биотехнологии и медицине. Тем не менее, вопрос о механизмах образования и роли каталитических антител в функционировании иммунной системы в норме и при патологии остается недостаточно изученным.

### 1.2.1. Механизмы образования каталитических антител

Основные механизмы образования антител с ферментативными свойствами к настоящему времени достаточно хорошо изучены *in vitro* в экспериментах с моноклональными антителами. Однако возможность реализации того или иного механизма *in vivo* оценить достаточно сложно. Тем не менее, существует несколько механизмов образования каталитических антител (Рис. 1).

Первый механизм генерации каталитических антител связан с генетическими механизмами, лежащими в основе разнообразия продуцируемых антител организма (Рис. 1 А). Как известно, молекула антитела человека (а также В-клеточного рецептора) состоит из двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждая H-цепь и L-цепь содержит константные (C) и переменные (V) домены, гены которых находятся на 14-й хромосоме (гены тяжелой цепи), а также второй (гены легкой цепи К-типа) и 12-й хромосоме (гены легкой цепи λ-типа) [172]. Каждый ген H- и L-цепи содержит константный сегмент (Constant - C), кодирующий константный домен антител, а также несколько копий трех разных типов сегментов филогенетически консервативных генов зародышевой линии (variable – V, diversity – D и joining – J), кодирующих переменный домен белков антител. Удивительное разнообразие продуцируемых организмом антител (теоретически  $10^{24} - 10^{26}$  возможных вариантов) обусловлено процессами V-(D)-J-рекомбинации и соматической гипермутации зародышевых генов, протекающей после антигенной стимуляции [173, 174].



**Рис. 1.** Различные механизмы образования каталитических антител. А – адаптивное созревание нуклеофильных центров антител, происходящих из исходных зародышевых генов иммуноглобулинов; Б – иммунизация стабильным аналогом переходного состояния химической реакции; В – иммунизация антигеном, конъюгированным с ковалентным реактивным аналогом (КРА); Г – образование абзимов за счет идиотип-антиидиотипических взаимодействий антител. Адаптировано из работы [196].

В переменных доменах белков антител, кодируемых исходными консервативными зародышевыми генами, были обнаружены нуклеофильные сайты, способные катализировать химические реакции по механизму нуклеофильного катализа [175, 176]. Формальное доказательство врожденного происхождения способности к нуклеофильному катализу на примере протеолитической активности было получено из исследования субъединицы легкой цепи антитела, гидролизующего ВИП. Каталитические аминокислотные остатки (Ser27-His93-Asp1), идентифицированные сайт-направленным мутагенезом, также были закодированы в исходных зародышевых генах переменной области легкой цепи [177]. Последовательности зрелой и зародышевой легкой цепи иммуноглобулина отличались всего на четыре аминокислоты, пространственно удаленные от каталитического сайта. Замена аминокислот путем мутагенеза на исходные, характерные для зародышевой линии, не приводила к потере каталитической активности [178], подтверждая врожденное происхождение активности. Группа французских ученых, используя биоинформатические методы, показала, что гены, кодирующие каталитические участки антител, проявляют высокую степень гомологии с их зародышевыми аналогами [176]. Следовательно, процесс созревания путем накопления соматических гипермутаций имеет меньшее значение для каталитической функции антител. Авторы работы [179] использовали фосфорорганические соединения, известные ингибиторы сериновых протеаз, такие как дифторизопропилфосфат и фосфонатные диэфиры, содержащие сильно электрофильный атом фосфора, для доказательства нуклеофильной природы каталитической активности присущей антителам. Оказалось, что переменные домены практически всех антител содержат нуклеофильные сайты. Имеющиеся данные позволили авторам обзора [175] предположить, что каталитическая активность возникла в течение миллионов лет эволюции у более низших организмов, содержащих первую узнаваемую иммунную систему, и что каталитический иммунитет является важным защитным механизмом против чужеродных антигенов у этих организмов. Таким образом, один из механизмов образования каталитических антител заложен непосредственно в самой иммунной системе организма (Рис. 1 А).

Нуклеофильные свойства обусловлены точным пространственным позиционированием и внутримолекулярной активацией некоторых аминокислот, например каталитической триады, характерной для сериновых протеаз, в которой атом кислорода гидроксильной группы Ser способен к нуклеофильной атаке на слабоэлектрофильный углерод карбонильных связей из-за наличия водородной связи с остатками His и Asp [180]. Именно такой механизм катализа характерен для каталитических антител с протеолитической активностью, хотя возможны и другие

варианты катализа [181]. Кроме того в катализе важную роль могут играть и другие аминокислоты: лизин, гистидин, треонин и тирозин [182]. Например, лизин в положении 89 располагается в активном центре легкой цепи моноклонального антитела 93F3, катализирующего альдозлазную реакцию [183]. Также показано, что константные домены играют важную роль в регуляции каталитической активности антител. В частности, при совместной экспрессии переменного домена с константным доменом IgM протеолитическая активность была гораздо выше, чем при совместной экспрессии с константным доменом IgG [184]. Интересно, что некоторые белки, подвергнутые необратимой тепловой денатурации, проявляют повышенную нуклеофильную активность [179]. Показано, что сайт связывания одного антитела принимает различные конформации, что приводит к мультиспецифичности [185]. Наблюдаемый эффект можно объяснить наличием внутренне неупорядоченных мотивов (intrinsically disordered regions) в молекуле иммуноглобулина [186, 187]. Эти данные позволяют предположить о важной роли конформации белковой молекулы для осуществления нуклеофильного катализа.

Тем не менее, генерация каталитических антител ограничена процессами созревания В-клеток. При повторной встрече с антигеном, его взаимодействие с В-клеточным рецептором (BCR) должно приводить к активации пролиферации В-клеток. Быстрая деградация антигена в случае наличия каталитической активности у BCR, будет лишать В-клетки стимуляции, необходимой для деления. Однако в условиях избытка антигена данный механизм будет иметь меньшее значение. В целом, скорость катализа, демонстрируемая антителами, будет ограничена скоростью проведения стимулирующего сигнала от BCR для индукции пролиферации [175]. Скорости катализа экспрессируемыми на поверхности клетки BCR, принадлежащим к различным классам ( $\mu$ ,  $\gamma$  и  $\alpha$ ), могут различаться. Скорости передачи трансмембранных сигналов зависят от силы взаимодействия с корецепторными молекулами в комплексе с BCR (например, CD79a/CD79b, CD19, Syk и Lyn), а также от уровня экспрессии этих молекул. При этом нарушение проведения сигналов через BCR может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний [188, 189], что в свою очередь будет способствовать увеличению продукции каталитических антител [190].

Важно отметить, что нуклеофильная реакционная способность антител является необходимым, но не достаточным условием для ковалентного катализа. Помимо этого, антитела должны способствовать стабилизации промежуточных соединений реакции, а также высвобождению фрагментов продукта реакции из активного сайта. Поэтому существуют другие механизмы образования каталитических антител.



Вторым механизмом образования каталитических антител является иммунизация стабильными аналогами переходных состояний химических реакций (transition state analogs, TSA) (Рис. 1 *Б*). Образование каталитических антител, которые бы стабилизировали промежуточные продукты реакции, находящиеся в нестабильном переходном состоянии, осложняется тем, что такие продукты неустойчивы и существуют короткий период времени. Поэтому для иммунизации в качестве гаптен используют стабильные аналоги переходных состояний, которые имитируют переходное состояние для интересующей реакции с учетом стереохимии и распределения заряда. Образующие антитела будут комплементарны этому переходному состоянию и, таким образом, будут приводить к каталитическому ускорению этой реакции. Как было указано выше, именно таким методом были получены первые искусственные каталитические антитела [166, 167, 168]. К настоящему времени с помощью такого подхода получены абзимы, катализирующие гидролиз амидов и сложных эфиров, а также реакции циклизации [191, 192], декарбоксилирования [193], лактонизации [194], окислительно-восстановительные реакции [195] и другие. Причем описаны реакции, для которых не существует аналогов среди природных ферментов [157, 196]. Также получены абзимы, для которых требуются кофакторы, аналогичные классическим ферментам [197]. Как развитие данного направления Р. Лернером предложена концепция «реактивной иммунизации» (Рис. 1 *В*), при которой организмы иммунизировались высокореактивными гаптенами, предназначенными для ковалентной связи с нуклеофильным BCR, формируя таким образом TSA [198]. Ковалентные реактивные аналоги (КРА), которые ковалентно связываются с нуклеофильными остатками BCR, были использованы С. Полем и его сотрудниками для получения абзимов, гидролизующих белок gp120 оболочки вируса ВИЧ-1 [199]. В качестве иммуногена использовался белок gp120, конъюгированный с КРА. Таким же подходом были получены абзимы, гидролизующие  $\beta$ -амилоид [200]. Таким образом, третий механизм образования каталитических антител заключается в иммунизации антигенами, конъюгированными с КРА, что приводит к образованию ковалентного комплекса с BCR и индукции адаптивного созревания каталитических антител, несущих нуклеофильные сайты.

Четвертый механизм образования абзимов основан на теории идиотип-антиидиотипической сети Эрне (Рис. 1 *Г*) [201]. Согласно этой теории, иммунизация животного антигеном приводит к получению антител 1-го поколения (Ab1) с антигенсвязывающим сайтом, специфичным для эпитопа на антигене. Иммунизация переменной областью Ab1 индуцирует образование антител 2-го поколения (Ab2), антигенсвязывающий домен которых является комплементарным переменной области

Ab1 и в некоторых случаях является внутренним образом антигенного эпитопа. Если исходным антигеном является фермент, то некоторые из Ab2 будут являться аналогами активного центра фермента и, таким образом, будут каталитически активными (Рис. 1 Г) [196]. С помощью такого метода были получены моноклональные абзимы с эстеразной [202],  $\beta$ -лактамазной [203], карбоксипептидазной [204], аллииназной [205], протеолитической [206], РНК- и ДНК-гидролизующей активностью [207, 208, 209].

Помимо перечисленных механизмов к образованию каталитических антител может приводить и классическая иммунизация различными антигенами, в том числе конъюгированными с адьювантами. Иммуногенами могут выступать как крупные молекулы (ДНК, РНК, белки) [210, 211, 212, 213], так и гаптены (пептиды, олигосахариды, химические соединения) [214, 215]. Кроме того, антигены собственных тканей организма могут выступать в качестве иммуногенов. Вследствие различных деструктивных процессов, таких как окислительный стресс, воспаление, воздействие токсических веществ и факторов окружающей среды, некоторые молекулы могут изменять свою конформацию и приобретать иммуногенные свойства [216]. Гибель клеток путем апоптоза также может являться источником аутоантигенов [217]. При взаимодействии с белками некоторые антигены могут принимать конформацию, аналогичную структурам переходных состояний химических реакций. Поэтому образование каталитических антител в живом организме может осуществляться по всем перечисленным механизмам: за счет адаптивного созревания нуклеофильных центров антител, происходящих из исходных зародышевых генов; за счет образования антител к аналогам переходных состояний; за счет иммунизации реактивными аналогами; за счет идиотип-антиидиотипических взаимодействий антител (Рис. 1). Таким образом, общий пул иммуноглобулинов организма состоит не только из высокоаффинных и специфичных «связывающих» антител, но и каталитических антител, обладающих меньшей аффинностью и специфичностью. Однако оценить количество образующихся каталитических антител достаточно сложно, поскольку это зависит от индивидуальных особенностей организма, природы иммуногена, вызвавшего образование антител, и других причин. Анализ наличия каталитических мотивов сериновых протеаз среди известных структур антител в Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) показал, что 7,4% антител имеют характерные мотивы каталитической триады серинового типа [218]. Однако не все антитела, имеющие мотив сериновой каталитической триады, проявляют каталитическую активность, что объясняется структурными и пространственными особенностями  $F_{ab}$  домена антител. Тем не менее, ясно, что усиление образования

каталитических антител происходит при патологических состояниях организма, особенно при заболеваниях, связанных с нарушениями в иммунной системе.

### 1.2.2. Абзимы при различных заболеваниях

Имеющаяся в настоящее время информация о *природных*, т.е. образующихся в организме естественным путем, каталитических антителах представлена в Таблице 1. В данную таблицу включены основные данные о каталитической активности и субстратной специфичности иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgM, sIgA), обнаруженных в сыворотке крови, СМЖ и молоке человека в норме и при различных заболеваниях.

**Таблица 1.** Каталитические активности природных антител в норме и при различных заболеваниях человека.

Заболевание/ состояние	Каталитическая активность антител	Субстрат	Литера- турные источники
<b>Аутоиммунные и нейродегенеративные заболевания</b>			
Системная красная волчанка	ДНК-гидролизующая	pUC19*, d(pA) <sub>10</sub> *, d(pA) <sub>13</sub>	219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227
	РНК-гидролизующая	p(A) <sub>13</sub> , p(U) <sub>10</sub> , poly(A), poly(C), poly(U), cСМР, РНК дрожжей,	
	Протеолитическая	ОБМ**, ОП <sub>17</sub> ОБМ, ОП <sub>19</sub> ОБМ, Гистон-Н1**	
	Амилолитическая	Различные мальтоолигосахариды	
Рассеянный склероз (IgG, IgA и IgM из сыворотки крови и СМЖ)	ДНК-гидролизующая	гетероОДН <sub>15</sub> , d(pT) <sub>10</sub>	228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 227
	РНК-гидролизующая	poly(A), poly(C), poly(U), cСМР	
	Протеолитическая	ОБМ, ОП <sub>85-101</sub> ОБМ, Н-Pro- Phe-Arg-MCA	
	Амилолитическая	Различные мальтоолигосахариды	
Болезнь Альцгеймера	Протеолитическая	β-амилоид, Glu-Ala-Arg- MCA	237
Тиреоидит Хашимото (аутоиммунный тиреоидит)	Протеолитическая	Pro-Phe-Arg-MCA, тиреоглобулин	238, 239, 245
	ДНК-гидролизующая	pBR322	
	РНК-гидролизующая	poly(A), poly(C), poly(U), cСМР, РНК дрожжей, тРНК <sup>Phe</sup> , тРНК <sup>Lys</sup>	
Ревматоидный артрит	Протеолитическая	Pro-Phe-Arg-MCA и др.	240

Системная склеродермия	ДНК-гидролизующая	pUC19	241
Приобретенная гемофилия	Протеолитическая	Фактор-VIII, фактор-IX	242, 243
Спондилоартропатии, полиартрит	ДНК-гидролизующая	ДНК тимуса телят, pBR322	244, 245
	РНК-гидролизующая	poly(A), poly(C), poly(U), cCMP, РНК дрожжей, тРНК <sup>Phe</sup> , тРНК <sup>Lys</sup>	
Аутоиммунный миокардит	Протеолитическая	Кардиомиозин	246
	ДНК-гидролизующая	Плазмидная ДНК	
<b>Воспалительные и инфекционные заболевания</b>			
Бронхиальная астма	Протеолитическая	ВИП	169
Сепсис	Протеолитическая	фактор-VIII, фактор-IX, Pro-Phe-Arg-MCA	247
ВИЧ-инфекция (IgG и IgM)	ДНК-гидролизующая	pBluescript	248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256
	Протеолитическая	β-казеин, обратная транскриптаза и интегразы** ВИЧ, гистоны** H1, H2a, H2b, H3, H4, различные пептиды.	
Гепатиты А, В, С, D	ДНК-гидролизующая	pBR322	257
	РНК-гидролизующая	cCMP, poly(U), poly(A), poly(C), тРНК <sup>Phe</sup>	
Стрептококковая инфекция	ДНК-гидролизующая	pBluescript	258
Урогенитальный хламидиоз, связанный с артритом	ДНК-гидролизующая	pBluescript	258
Менингококковый менингит	ДНК-гидролизующая	pBluescript	258
Шигеллез	ДНК-гидролизующая	pBluescript	258
Гнойные хирургические инфекции, вызванные <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Staphylococcus epidermidis</i>	ДНК-гидролизующая	pBluescript	258
Мочеполовой уреоплазмоз, связанный с реактивным артритом	ДНК-гидролизующая	pBluescript	258

Клещевой энцефалит	ДНК-гидролизующая	pBluescript	258
<b>Онкологические заболевания</b>			
Множественная миелома (легкие цепи IgG)	Сиалидазная	2'- (4-метилумбеллиферил) - $\alpha$ -D-N-ацетилнейраминовая кислота	259, 260, 261, 262
	Протеолитическая	БАПНА, протромбин	
	ДНК-гидролизующая	pUC19	
Хронический лимфоцитарный лейкоз	ДНК-гидролизующая	pUC19	262
Мантийноклеточная лимфома	ДНК-гидролизующая	pUC19	262
Лимфома маргинальной зоны	ДНК-гидролизующая	pUC19	262
Фолликулярная лимфома	ДНК-гидролизующая	pUC19	262
Макроглобулинемия Вальденстрема	Протеолитическая	$\beta$ -амилоид	237
<b>Аллоиммунные заболевания</b>			
Гемофилия А (после заместительной терапии)	Протеолитическая	фактор-VIII	263, 264, 265
Реакция отторжения почки при трансплантации	Протеолитическая	Pro-Phe-Arg-MCA, фактор-VIII, фактор-IX	266
<b>Метаболические заболевания</b>			
Сахарный диабет	ДНК-гидролизующая	pBluescript	267, 268
	Протеолитическая	БАПНА, $\beta$ -казеин	
<b>Психические расстройства</b>			
Аутизм (IgA IgG и IgM)	Протеолитическая	ОБМ**, D-Ile-Pro-Arg-pNA, D-Leu-pNA, и др.	269
<b>Нормальные физиологические состояния</b>			
Беременность и вскармливание новорожденного (sIgA и IgG из молока и сыворотки крови)	ДНК-гидролизующая	pBR322, ДНК фага $\lambda$ , тРНК <sup>Lys</sup> , d(pA) <sub>10</sub> , d(pT) <sub>10</sub> , d(pC) <sub>10</sub>	270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 227
	РНК-гидролизующая	r(A) <sub>10</sub> , r(T) <sub>10</sub> , r(C) <sub>10</sub>	
	Амилазная	Различные мальтоолигосахариды	
	Нуклеотид-гидролизующая	АТФ, ГТФ, СТФ, dАТФ, dГТФ, dСТФ, АМФ и др.	
	Протеолитическая	$\beta$ -казеин, БСА, протеаза-активируемый рецептор 2*,	

		БАПНА	
	Протеин-киназная	$\beta$ -казеин в присутствии $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]NTP или $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]dNTP	
	Липид-киназная	Липиды в присутствии $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР и $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]Рi	
	Олиго- и полисахарид-киназная	Олиго- и полисахариды в присутствии $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР и $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]Рi	
Здоровье (отсутствие заболеваний) (IgA IgG и IgM)	Протеолитическая	Pro-Phe-Arg-MCA, Glu-Ala-Arg-АМС и др.; белок gp120 ВИЧ, транстиретин, внеклеточный фибриноген связывающий белок <i>S. aureus</i>	240, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287
	Пероксидазная	ДАБ, АВТС, ОРД, рНҚ и др. в присутствии $\text{H}_2\text{O}_2$	
	Оксидоредуктазная	ДАБ, АВТС, ОРД, рНҚ и др. в отсутствие $\text{H}_2\text{O}_2$	

*Примечания:* \*Данные получены для  $F_{ab}$  IgG. \*\*В экспериментах использовали антитела, полученные на сорбенте с иммобилизованным антигеном.

*Сокращения:* АМС – 7-амино-4-метилкумарин, АВТС – диаммониевая соль 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиозолин-6-сульфоновой кислоты), МСА – 4-метилкумарил-7-амид, ОРД – о-фенилендиамин, рНҚ – гидрохинон, рНА – п-нитроанилид, БАПНА – N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинин-4-нитроанилид, БСА – бычий сывороточный альбумин, ВИП – вазоактивный интестинальный пептид, ДАБ – 3,3'-диаминобензидин, ОБМ – основной белок миелина, ОДН – олигодезоксинуклеотид, ОП – олигопептид, СМЖ – спинномозговая жидкость.

Как видно из представленных данных, аутоиммунные заболевания (АИЗ) сопровождаются образованием абзимов с самым широким репертуаром каталитической активности (см. Таблицу 1). При данных заболеваниях образуются каталитические антитела, гидролизующие ДНК, РНК, олигонуклеотиды, белки, пептиды и олигосахариды [219-246]. Следует отметить, что наиболее высокий уровень каталитической активности абзимов обнаруживается при таких тяжелых аутоиммунных патологиях, как системная красная волчанка (СКВ) и рассеянный склероз (РС) [219-236]. Как известно, АИЗ характеризуются спонтанным образованием аутоантител к разнообразным аутоантигенам. Например, повышенные титры анти-ДНК антител обнаружены при СКВ у 38% больных, а при РС – у 17-18% пациентов [267]. При этом ДНК-гидролизующие абзимы обнаружены у 90-95% больных РС и СКВ [288]. Таким образом, отсутствует корреляция между титром аутоантител и наличием каталитических антител. Это связано с тем, что увеличение титров аутоантител происходит на поздних стадиях АИЗ, либо во время обострения. Поэтому очевидно, что образование антител, которые только связывают антиген, и абзимов, не только связывающих, но и гидролизующих антиген, происходит в различных

клонах В-лимфоцитов, а также обусловлено различными механизмами. Тем не менее, имеются литературные данные, указывающие на то, что некоторые сайты гидролиза антигена находятся в иммунодоминантных областях молекулы (т.е. к которым образуются антитела), что указывает на общность механизмов образования абзимов и обычных антител. Например, при РС обнаружены антитела, гидролизующие основной белок миелина (ОБМ), причем 5 из 6 основных сайтов гидролиза ОБМ находятся в иммунодоминантных областях молекулы ОБМ после Arg или Lys [233]. Таким образом, можно предположить, что при развитии АИЗ происходит увеличение количества клонов В-лимфоцитов, продуцирующих аутоантитела, а также абзимы.

Известно, что В-лимфоциты синтезируют структурно и функционально различные классы антител на разных этапах жизненного цикла. Согласно литературным данным иммуноглобулины класса М отличаются способностью катализировать гидролиз модельных субстратов со скоростями, существенно большими, чем иммуноглобулины G, продуцируемые на более поздних стадиях дифференцировки В-клеток после переключения синтеза изотипов антител [237]. В частности, IgM из сыворотки больных СКВ обладали в 5-10 раз большей ДНК- и РНК-гидролизующей активностью, чем IgG из той же сыворотки [222]. В другой работе показано, что специфическая каталитическая активность IgM и sIgA из сывороток пациентов с РС в реакции гидролиза ОБМ были значительно выше, чем у IgG [235]. В работах под руководством S. Paul установлено, что IgM обладают в 344 раза большей протеолитической активностью, а IgA – в 3 раза большей активностью, по сравнению с IgG [289, 290]. Таким образом, по уровню каталитической активности иммуноглобулины различных классов можно расположить следующим образом: IgM>sIgA>IgG. Ожидается, что IgM обладает наибольшей активностью, поскольку эта молекула имеет наименьшее сродство к субстрату и гибкий антиген-связывающий домен. Высокая каталитическая активность IgM по сравнению с IgG не объясняется эффектами авидности, поскольку возможности мультивалентного связывания IgM препятствуют низким концентрациям субстрата, используемым в реакции. Правдоподобное объяснение результатов, приведенных здесь, заключается в том, что протеолитическая активность теряется при соматической гипермутации V-домена после того, как В-клетки переключаются с производства антител класса М на антитела класса G [281]. Другим объяснением является уникальная доменная архитектура IgM, которая способствует поддержанию целостности каталитического сайта, а в случае переключения на синтез другого изотипа, приводит к снижению каталитической активности [184].

Важным заключением из приведенных данных является то, что образование каталитических антител тесно связано с наличием иммунологических нарушений и

особенно аутоиммунных процессов. Имеющиеся данные указывают на то, что эффективное функционирование клонов В-лимфоцитов, продуцирующих абзимы, запускается при наличии выраженного аутоиммунного процесса [267]. Это подтверждается исследованиями на мышинных моделях. Так у мышей линии MRL-lpr/lpr, подверженных спонтанному развитию аутоиммунных заболеваний (СКВ), появление каталитических антител было связано с глубокими нарушениями в профиле дифференцировки стволовых кроветворных клеток костного мозга (СКККМ) и подавлением апоптоза клеток [291]. Наибольший прирост в уровне активности абзимов был обнаружен у мышей, иммунизированных ДНК. При этом показано, что ДНК-гидролизующая активность возникает на самых ранних стадиях развития аутоиммунной патологии, когда общий титр антител к ДНК еще очень низкий и сопоставим с таковым у здоровых мышей, причем дальнейшее увеличение активности коррелирует с развитием клинических симптомов, а также с увеличением титров анти-ДНК-антител в сыворотке и белка в моче [291]. В другом исследовании обнаружено, что после иммунизации гаптенем-аналогом переходного состояния у мышей линии MRL/lpr, склонных к развитию СКВ, образуется гораздо больше каталитических антител, чем у мышей дикого типа MRL/++, или BALB/c [190]. Таким образом, образование абзимов с ДНКазной активностью является ранним и четким *маркером* аутоиммунной патологии.

При развитии аутоиммунной патологии образуются абзимы, способные гидролизовать специфические белки (см. Таблицу 1). Как было указано выше, при РС и СКВ образуются абзимы, гидролизующие ОБМ [224–226, 233–235]. Абзимы у больных СКВ также способны гидролизовать гистон H1 [225]. При тиреоидите Хашимото обнаружены абзимы расщепляющие тиреоглобулин, а также флуоресцентно-меченый трипептид Pro-Phe-Arg-MCA [238]. Авторы указанной работы отмечают низкое значение  $K_m$  для тиреоглобулина (39 нМ) в сравнении с трипептидом (18 мкМ) и предполагают, что этап связывания тиреоглобулина является специфическим, а гидролитический этап реакции менее специфичен, а также что сайт связывания и каталитический сайт находятся в непосредственной близости. Интересным примером протеолитических абзимов являются IgG, гидролизующие факторы VIII и IX свертывающей системы крови у больных приобретенной гемофилией, вызванной спонтанным образованием аутоантител к этим факторам [242, 243]. Причем в большинстве случаев IgG-опосредованный гидролиз фактора IX приводил к активации этого фактора, что может частично компенсировать опосредованное антителом ингибирование эндогенного фактора VIII. Протеолитические абзимы также образуются и при аутоиммунном миокардите и гидролизуют кардиомиозин



[246]. Таким образом, абзимы с протеолитической активностью способны гидролизовать функционально важные белки и могут существенно влиять на патогенез заболеваний.

Абзимы также образуются при воспалительных и инфекционных заболеваниях. Как отмечено в главе 2, самыми первыми природными абзимами были идентифицированы ВИП-гидролизующие антитела у больных бронхиальной астмой [169]. При сепсисе обнаружены абзимы, гидролитически расщепляющие факторы VIII и IX системы свертывания крови [247]. Как указывают авторы кумулятивная выживаемость среди пациентов с высокими уровнями IgG-опосредованного гидролиза была выше, по сравнению с пациентами с низкими показателями гидролиза. Также наблюдалась обратная корреляция между маркерами тяжести синдрома диссеминированной внутрисосудистой коагуляции и уровнем активности IgG пациентов с сепсисом, что указывает на то, что каталитические IgG могут участвовать в контроле диссеминированного микрососудистого тромбоза, приводящего к полиорганной недостаточности. Другим примером абзимов при инфекционных заболеваниях являются каталитические IgG и IgM больных ВИЧ-инфекцией, гидролизующие обратную транскриптазу и интегразу ВИЧ [249-253], гистоны (H1, H2a, H2b, H3, H4) [254-256],  $\beta$ -казеин [249] и различные пептиды. Установлено, что обнаруженные протеолитические абзимы представляют собой смесь субфракций антител, отличающиеся по биохимическим параметрам в зависимости от пациента. Часть абзимов проявляет сериновую протеазо-подобную каталитическую активность, другие являются металло-зависимыми, кислыми или тиоловыми протеазами. Часть этих антител может проявлять защитные свойства, поскольку разрушает вирусные белки. Также отмечено, что абзимы, гидролизующие гистоны могут нарушать сборку нуклеосом и процесс связывания с ДНК, поэтому могут играть негативную роль в патогенезе синдрома приобретенного иммунодефицита.

При вирусных и бактериальных заболеваниях также образуются абзимы, гидролизующие нуклеиновые кислоты. В частности, при ВИЧ-инфекции и гепатитах А, В, С, D обнаружены антитела, гидролизующие плазмидную ДНК (pBluescript, pBR322) [248, 257]. При гепатитах также образуются РНК-гидролизующие антитела, расщепляющие cCMP, poly(U), poly(A), poly(C), тРНК [257]. Помимо вирусных заболеваний абзимы с нуклеазными активностями обнаружены при бактериальных инфекциях. В среднем каталитическая активность IgG при бактериальных инфекциях значительно ниже, чем при аутоиммунных патологиях. Уровень ДНКазной активности увеличивается в следующем порядке: стрептококковая инфекция < урогенитальный хламидиоз, связанный с артритом (болезнь Рейтера) < менингококковый менингит < шигеллез < гнойные хирургические инфекции, вызванные *Staphylococcus aureus* < гнойные хирургические инфекции,

вызванные *Staphylococcus epidermidis* < мочеполовой уреоплазмоз, связанный с реактивным артритом [258]. ДНКазная активность отсутствовала у антител здоровых доноров, а также больных гриппом, пневмонией, тонзиллитом, туберкулезом, язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и некоторыми видами онкологических заболеваний (опухоли матки, молочной железы, желудка и кишечника) [257].

При онкологических заболеваниях каталитические антитела обнаружены только при опухолях лимфатической системы, связанных с пролиферацией В-клеток: множественной миеломе, хроническом лимфоцитарном лейкозе, мантийноклеточной лимфоме, лимфоме маргинальной зоны, фолликулярной лимфоме [262]. При заболеваниях, связанных с пролиферацией Т-лимфоцитов, ДНКазная активность отсутствовала при неходжкинской лимфоме Т-клеток, синдроме Сезари, остром Т-лимфобластном лейкозе и лимфоме Ходжкина [262]. Эти данные указывают на увеличение вероятности образования клонов, продуцирующих ДНК-гидролизующие абзимы в опухолях, полученных из относительно зрелых В-клеток, по сравнению с другими типами злокачественной лимфопролиферации [262]. Кроме того установлено, что ДНК-абзимы преимущественно присутствуют в крови пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, осложненными различными аутоиммунными нарушениями [262]. Это наблюдение позволяет предположить о схожих механизмах образования абзимов при опухолевых и аутоиммунных заболеваниях. Помимо ДНК-гидролизующих абзимов при множественной миеломе и макроглобулинемии Вальденстрема образуются абзимы с протеолитической активностью [260], гидролизующие протромбин [261] и  $\beta$ -амилоид [237]. Интересным примером абзимов, образующихся при множественной миеломе являются десиабилирующие антитела [259]. Модификация уровня поверхностного сиалилирования молекул под действием данных антител может приводить к изменению опухолегенности и метастатического потенциала клеток, а также облегчать удаление апоптотических клеток.

Протеолитические антитела образуются также при аллоиммунных заболеваниях. Например, при гемофилии А после заместительной терапии обнаружены антитела, гидролизующие фактор VIII свертывающей системы [263–265], а у больных с реакцией отторжения почки при трансплантации продуцируются абзимы, гидролизующие коагуляционные факторы VIII и IX, но не фактор VII и протромбин [266], тем самым регулируя состояние прокоагуляции.

Абзимы при метаболических заболеваниях обнаружены только при сахарном диабете. В частности, у больных найдены антитела, гидролизующие ДНК [267] и  $\beta$ -казеин [268]. При этом показано, что у пациентов с диабетом I типа образуются антитела и иммунные комплексы против глюкозо-регулируемого белка 94 (Grp94), который

относится к белкам теплового шока [268]. Кроме того, обнаружено образование аддуктов  $F_{ab}/(F_{ab})_2$  с Grp94, а также антиидиотипических антител против этих аддуктов, которые ингибировали протеолитическую активность [268]. Таким образом, это первый пример антиидиотипических антител, которые подавляют протеолитическую активность IgG.

Долгое время считалось, что абзимы не образуются у здоровых людей. Первым примером абзимов в отсутствие каких-либо заболеваний стали sIgA молока человека, катализирующие фосфорилирование белков [277]. Впоследствии были обнаружены липид-киназная [278] и полисахарид-киназная [279] активности IgG и sIgA молока человека. Таким образом, впервые были идентифицированы природные абзимы, катализирующие не реакцию деградации, а реакцию синтеза. Причем данные реакции являются двусубстратными реакциями. Интересно, что в качестве донора фосфатной группы антитела способны использовать не только АТР, но и другие нуклеотиды (dАТР, GTP, dGTP, UTP, TTP), в том числе и ортофосфат.

В дальнейшем были обнаружены IgG и sIgA молока человека способные катализировать реакции гидролиза ДНК [270, 271, 274], РНК [271, 274], олигонуклеотидов [271, 273, 274]. Помимо этого в молоке здоровых женщин показано наличие абзимов, гидролизующих  $\beta$ -казеин [275], а также олигосахариды [227, 272]. Следует отметить, что антитела молока человека характеризуются более высокой активностью по сравнению с большинством известных абзимов больных АИЗ. В целом, можно предположить, что абзимы молока человека играют важную роль в защите новорожденного от вирусных и бактериальных инфекций.

У клинически здоровых доноров в сыворотке крови обнаружены протеолитические абзимы (см. Таблицу 1). Например, у неинфицированных людей показано наличие каталитических IgG и IgM, гидролизующих гликопротеин gp120 оболочки ВИЧ [281, 282, 283]. Один из сайтов расщепления (Lys432-Ala433) расположен в области, являющейся суперантигенной детерминантой. Также IgM здоровых доноров способны гидролизовать белок транстиретин, способный образовывать агрегаты и приводить к развитию амилоидоза [284]. Помимо этого, обнаружены абзимы, гидролизующие внеклеточный фибриноген связывающий белок *S. aureus* [285]. Таким образом, каталитические антитела у здоровых доноров могут участвовать в защите организма и являться первой линией защиты от различного рода патогенов.

Антитела здоровых доноров обладают пероксидазной и оксидоредуктазной активностями и способны окислять различные токсические соединения [286, 287]. Наряду с известными антиоксидантными ферментами данные абзимы могут защищать организм от окислительного стресса.

Ключевым выводом из вышеизложенного является то, что образование каталитических антител является неотъемлемым свойством иммунной системы. Однако увеличение спектра образующихся абзимов, в том числе гидролизующих нуклеиновые кислоты и специфические белки, происходит при глубоких изменениях в иммунной системе. К увеличению уровня каталитических антител приводят аутоиммунные реакции, воспалительные и инфекционные процессы, а также злокачественная трансформация В-клеток. Но наибольшее увеличение каталитической активности антител происходит при аутоиммунной патологии. Наличие каталитических антител, гидролизующих белки и нуклеиновые кислоты, является самым ранним *признаком иммунологических нарушений*.

### 1.2.3. Абзимы при заболеваниях центральной нервной системы

Некоторые аутоиммунные заболевания ЦНС сопровождаются образованием каталитических антител. Как упоминалось ранее, образующиеся при рассеянном склерозе (РС) каталитические антитела характеризуются большим разнообразием каталитических активностей (см. Таблицу 1), а также высоким уровнем относительной активности по сравнению с другими заболеваниями. При РС обнаружены IgG, IgA и IgM, гидролизующие ДНК, РНК, ОБМ и олигосахариды [228-236]. Важно отметить, что уровень удельной ДНК-гидролизующей активности IgG из СМЖ оказался примерно в 49 раз выше, по сравнению с активностью IgG из сыворотки [232]. Предполагается, что гидролиз ОБМ под действием антител может объяснять развитие нейродегенерации при РС [233]. Таким образом, приведенные данные еще раз доказывают, что аутоиммунные заболевания сопровождаются появлением высокоактивных абзимов. В 2020 г. у больных РС также обнаружены IgG, обладающие супероксиддисмутазной и каталазной активностью [292].

При нейродегенеративных заболеваниях, в частности при болезни Альцгеймера, также происходит образование каталитических антител. У пациентов обнаружены IgM, гидролизующие  $\beta$ -амилоид и пептидные субстраты [237]. Показано, что каталитические антитела блокируют агрегацию и уменьшают токсичность  $\beta$ -амилоида. Следовательно, каталитические антитела при болезни Альцгеймера могут проявлять защитные свойства.

Среди психических расстройств абзимы обнаружены при аутизме. При этом заболевании показано наличие IgG и IgA, гидролизующих ОБМ [269]. Перфузионное введение таких абзимов крысам индуцирует снижение долгосрочного потенцирования в гиппокампе и нарушает синаптическую пластичность [269]. Сравнительно недавно Паршуковой Д.А. с соавторами обнаружены ОБМ-гидролизующие антитела при

шизофрении [293, 294]. Однако другие каталитические активности IgG при шизофрении не исследованы. Как указано в главе 1.1.6, шизофрения связана с различными иммунологическими нарушениями, в том числе в гуморальном звене иммунитета. Поэтому нельзя исключить, что при шизофрении также образуются специфические каталитические антитела. Актуальность изучения абзимов при шизофрении и других заболеваниях обусловлена тем, что каталитические антитела могут участвовать в патогенезе заболевания. Выяснение новых патологических механизмов, обусловленных каталитическими антителами, позволит разработать новые терапевтические стратегии лечения этих заболеваний. Также актуальность связана с возможностью использования каталитических антител в качестве специфических биомаркеров шизофрении.

#### **1.2.4. Биологическая роль абзимов и перспективы их применения в медицине и биотехнологии**

Исходя из данных, представленных в главах 1.2.2 и 1.2.3, образование каталитических антител является распространенным иммунологическим явлением. В связи с этим возникает вопрос: каталитическая активность является специфической функцией антител, или следствием дисфункции иммунной системы? Таким образом, биологическая роль абзимов не установлена. Основываясь на имеющихся литературных данных, можно говорить, как о патологической, так и защитной роли каталитических антител в организме. Возможно, биологическая роль абзимов зависит от конкретного заболевания.

Патологическая роль абзимов, гидролизующих ОБМ, очевидна при РС. Показано, что скорости катализа с помощью аутоантител к ОБМ являются одними из самых высоких значений, зарегистрированных для абзимов и, следовательно, достаточны для их патологических эффектов при медленном развитии нейродегенерации в ходе прогрессирования РС [233]. При тиреоидите Хашимото протеолиз тиреоглобулина под действием абзимов может приводить к нарушению функции щитовидной железы [238]. Гидролиз фактора VIII свертывающей системы крови аутоантителами больных гемофилией А в процессе заместительной терапии будет нарушать коагуляционный каскад и способствовать развитию кровотечений [263–265]. Вместе с тем, протеолиз протромбина под действием легких цепей антител больных множественной миеломой приводит к образованию фрагментов, активирующих превращение фибриногена в фибрин, что способствует тромбозу [261]. Снижение концентрации ВИП, вследствие гидролиза протеолитическими абзимами, может приводить к нарушению расслабления гладкой мускулатуры бронхов и дыхательной дисфункции при бронхиальной астме [295].

В случае ДНК-гидролизующих абзимов, их патологические эффекты обусловлены комплемент-независимой цитотоксичностью. Показано, что ДНК-гидролизующие антитела способны преодолевать плазматическую и ядерную мембрану различных клеток, вызывать фрагментацию ДНК и активировать апоптоз клеток через каспаза-зависимые механизмы [296, 297, 298]. К транслокации через мембрану способны не только фрагменты иммуноглобулинов (легкие цепи, F<sub>ab</sub>-домены) [298, 299], но и целые молекулы антител [297, 300]. Проникновение иммуноглобулинов в клетку осуществляется за счет взаимодействия с сульфатированными протеогликанами на поверхности клетки путем клатрин-независимого эндоцитоза [298]. Альтернативным вариантом реализации цитотоксической активности ДНК-абзимов является их взаимодействие с рецепторами на клеточной поверхности, которые вызывают апоптоз [301]. Однако не все ДНК-гидролизующие абзимы цитотоксичны. Показано, что ДНК-абзимы, полученные иммунизацией здоровых животных, или от пациентов с различными бактериальными и вирусными инфекциями, не являются цитотоксичными по отношению к опухолевым и нормальным клеткам [302].

Однако вместе с этим можно привести множество примеров положительной роли абзимов. Гидролитическое расщепление β-амилоида под действием протеолитических IgM снижает агрегацию и токсичность этого белка на нейрональных культурах клеток, тем самым препятствуя развитию болезни Альцгеймера [237]. Как было указано в главе 2.2, антитела, образующиеся при сепсисе и гидролизующие коагуляционные факторы VIII и IX, могут участвовать в регуляции диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [247]. Удаление тиреоглобулина из кровотока путем его деградации абзимами при тиреоидите Хашимото будет способствовать минимизации аутоиммунного ответа, снижению воздействия иммунной системы на этот белок и уменьшению вероятности вредных иммунокомплексных эффектов [238]. Защитную функцию выполняют также абзимы, гидролизующие интегразу и обратную транскриптазу ВИЧ [249, 253]. У здоровых доноров обнаружены IgM, способные гидролизовать транстиретин с неправильной конформацией, растворять токсичные виды этого белка и защищать от развития амилоидоза [284]. Антитела сыворотки здоровых, неинфицированных доноров обладают способностью гидролитически расщеплять белок gp120 ВИЧ [281, 282] и внеклеточный фибриноген связывающий белок *S. aureus* [285]. Авторы работы [283] полагают, что поскольку мукозальные IgA, а также сывороточные IgM, обладают высокой каталитической активностью и нейтрализуют ВИЧ, они составляют первую линию защиты от ВИЧ и других патогенов. При беременности образуются абзимы с ДНК- и РНК-гидролизующей активностью, которые помогают незрелой иммунной системе

новорожденного защищаться от инфекций путем разрушения нуклеиновых кислот вирусов и бактерий [302]. Другим доказательством защитной функции протеолитических абзимов молока человека является их способность активировать синтез дефензинов в эпителиальных клетках кишечника посредством гидролиза протеаза-активируемого рецептора 2 [276]. Абзимы с оксидоредуктазной активностью могут участвовать в регуляции окислительного стресса [286, 287]. Эти данные указывают на потенциальную защитную функцию конститутивно продуцируемых каталитических антител. Такой, своего рода «каталитический» иммунитет, частично закодированный в генах зародышевой линии, обеспечил эволюционные преимущества при выживании [284].

В целом, абзимы при одном и том же заболевании могут играть двойственную роль. Это хорошо иллюстрируется на примере ДНК-гидролизующих абзимов, которые с одной стороны могут быть цитотоксичными, а с другой защищать от вирусных инфекций. Поэтому особенно важно изучать весь спектр каталитических активностей антител при определенном заболевании, чтобы выяснить их роль при данной патологии.

Уникальная пространственная структура каталитических антител, сочетающая в себе высокую специфичность и функциональную активность, открывает большие возможности для разработки терапевтических средств на их основе. Несмотря на низкую скорость катализа по сравнению с классическими ферментами, а также неспособность реализовывать сложные динамические механизмы катализа, характерные для ферментов, абзимы, тем не менее, имеют множество преимуществ. Во-первых, каталитические антитела обладают низкой иммуногенностью. Во-вторых, иммуноглобулины циркулируют в крови длительное время (более двух недель) [303], в отличие от канонических ферментов, которые, при попадании в кровь, быстро инактивируются протеазами. Кроме того, антитела способны преодолевать гистогематический барьер и накапливаться в пораженных органах, в местах воспаления. В-третьих, абзимы обладают высокой специфичностью, которая может быть повышена путем различных генно-инженерных методов. В-четвертых, благодаря своей валентности, абзимы могут связывать и разрушать множество молекул антигена, в то время как классические антитела могут связывать только ограниченное число антигенов. Это позволяет уменьшать количество вводимых молекул антител для оказания значимых эффектов, что, в свою очередь, уменьшает риск побочных эффектов и стоимость терапии. Кроме того, быстрое удаление антигена из кровотока абзимами будет способствовать минимизации аутоиммунных реакций и снижению патологических иммунокомплексных эффектов, характерных для классических антител. В-пятых, с помощью биотехнологических методов абзимы можно

получить в больших количествах. В-шестых, благодаря генно-инженерным методам, теоретически можно создать абзимы практически к любому антигену.

В литературе имеется ряд обзоров о применении абзимов в медицине и биотехнологии [218, 301, 304, 305, 306]. Определенные надежды связаны с перспективой использования абзимов для лечения зависимостей от психоактивных веществ. В частности, разрабатываются моноклональные абзимы, гидролизующие кокаин и никотин [304, 305]. В лаборатории под руководством академика А.Г. Габиева занимаются разработкой абзимов, избирательно гидролизующих фосфорорганические соединения. С применением методов комбинаторной химии, технологий скрининга сверхвысокой пропускной способности (Ultrahigh-throughput screening techniques), квантово-механических расчетов (QM/MM calculations) для созревания антител *in silico*, было разработано каталитическое антитело A17, гидролизующее фосфорорганический пестицид параоксон [307, 308]. Абзимы также могут применяться для защиты от различных инфекций. В частности, в лаборатории Сидхура Пола (США) разрабатывается вакцина против ВИЧ, основанная на способности абзимов гидролизовать вирусный белок gp120 [306]. Для этого была создана организация Abzyme Research Foundation, занимающаяся сбором средств на производство этой вакцины. Испытания вакцины на людях назначены на 2021 г. Гликопротеин оболочки ВИЧ gp41 является еще одной мишенью для разработки каталитических антител. Помимо этого, разрабатывается каталитическое антитело, гидролизующее полисахариды капсулы бактерии *Cryptococcus neoformans* [309]. Установлено, что полученное моноклональное антитело 18B7 также эффективно расщепляет полисахариды грибковых клеток. Разработано моноклональное антитело UA15, гидролизующее уреазу бактерии *Helicobacter pylori*, вызывающей гастрит [218]. Показано, что использование данного антитела значительно снижает количество этой бактерии в желудке мышей. Синтезированы моноклональные легкие цепи, полученные от человека, вакцинированного против вируса бешенства, которые обладают протеазной активностью и защищают от инфицирования этим вирусом [305]. Разработанные ДНК-гидролизующие абзимы 22F6-L способны защищать от вируса гриппа типа А (H1N1) [218]. При болезни Альцгеймера разрабатываются антитела, гидролизующие  $\beta$ -амилоид. Разработан новый способ доставки адено-ассоциированного вирусного вектора, кодирующего ген  $\beta$ -амилоид-специфического каталитического антитела rAAV9-IgVL5D3 [310]. Адресная доставка гена антитела и его экспрессия непосредственно в головном мозге является безопасным и более эффективным подходом к профилактике и лечению болезни Альцгеймера, чем обычные анти- $\beta$ -амилоид-антитела. Для антицитокиновой терапии аутоиммунных заболеваний разработано моноклональное



антитело ETNF-6-H, гидролизующее фактор некроза опухоли  $\alpha$  [304]. Для коррекции окислительного стресса разработано Se-содержащее каталитическое антитело Se-scFv-2D8, обладающее глутатионпероксидазной активностью [304]. Интересны результаты корейских ученых, создавших однодоменное каталитическое антитело 3D8 VL, гидролизующее нуклеиновые кислоты [311]. Авторам удалось добиться значимого снижения уровня мРНК целевого гена Her2 в клетках карциномы молочной железы. Таким образом, создано сиквенс-специфичное, нуклеотид-гидролизующее, проникающее в клетки антитело, которое можно использовать для подавления экспрессии генов (gene silencing).

Помимо вышеперечисленного, не менее интересным применением каталитических антител, является абзимная пролекарственная терапия [304, 305]. В основе этого метода лежит технология антитело-направленной ферментной пролекарственной терапии (The antibody directed enzyme prodrug therapy). Метод основан на использовании антител против антигенов опухолевых клеток, конъюгированных с ферментами, для активации пролекарственной формы препарата непосредственно вблизи опухолевых клеток. Замена фермента на абзим уменьшает иммуногенность. Наиболее изученным абзимом для пролекарственной терапии является 38C2 антитело, проявляющее альдолазную активность и активирующее пролекарственную форму противоопухолевых препаратов доксорубина и камптотецина. Показано, что 38C2 ингибирует рост карциномы толстой кишки человека и линий рака простаты и уменьшает рост опухоли на животной модели нейробластомы [305]. Также 38C2 может применяться при сахарном диабете для активации альдол-модифицированного инсулина. Три антитела на основе гуманизированного 38C2 уже вошли в клинические испытания.

В настоящее время при финансовой поддержке Abzyme Research Foundation разрабатывается каталитическая вакцина против ВИЧ, которая индуцирует образование каталитических антител у пациентов с синдромом приобретенного иммунодефицита. Клинические испытания запланированы на 2021 год.

Таким образом, поскольку антитела представляют собой самый большой класс биологической терапии на фармацевтическом рынке, вполне вероятно, что абзимы в будущем станут источником новых терапевтических инструментов в медицине и биотехнологии.

### 1.3. Заключение по обзору литературы

Из приведенных в литературном обзоре данных следует, что шизофрения является заболеванием мультифакториальной природы. Развитие заболевания связано с нарушением нейромедиаторных систем в головном мозге. Однако конкретные молекулярные механизмы, приводящие к возникновению заболевания, остаются малоизученными. Известно, что шизофрения имеет выраженный генетический компонент. Наличие генетической предрасположенности может увеличивать риск развития оксидативных и иммунологических аномалий. Обнаружено множество доказательств дисфункции различных звеньев иммунной системы при шизофрении. Показано преобладание хронических воспалительных процессов, а также наличие нарушений в клеточном и гуморальном иммунитете. Однако исследования гуморальной иммунной системы при шизофрении направлены в основном на поиск различных аутоантител. Тем не менее, свойства иммуноглобулинов при шизофрении практически не изучены. Одним из важных признаков иммунологических нарушений, особенно при аутоиммунных заболеваниях, является образование каталитически активных антител, или абзимов. Поскольку при шизофрении изменения в иммунной системе затрагивают, в том числе, и гуморальный иммунитет, вполне вероятно, что каталитические антитела могут образовываться при этом заболевании. Каталитические антитела, гидролизующие белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды, обнаружены при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях, однако при шизофрении способность антител гидролизовать различные субстраты детально не исследована. Данная работа посвящена изучению каталитических активностей иммуноглобулинов класса G при шизофрении и исследованию их биохимических свойств.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Пациенты и биологический материал

В качестве биологического материала для выделения иммуноглобулинов использовали сыворотку крови 50 пациентов с шизофренией, а также 25 здоровых доноров, соответствующих по полу и возрасту. Сыворотка пациентов и здоровых доноров предоставлена отделением эндогенных расстройств ФГБНУ "Научно-исследовательского института психического здоровья" Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (НИИ психического здоровья ТНИМЦ). Протокол исследования был предварительно рассмотрен и утвержден этическим комитетом НИИ психического здоровья ТНИМЦ в соответствии с Хельсинкским соглашением по правам человека. У каждого обследуемого лица, либо его опекунов, получено информированное согласие на проведение исследования. Диагноз устанавливался врачами-психиатрами с использованием клинического интервью в соответствии с критериями МКБ-10. Для оценки тяжести психопатологических симптомов использовалась шкала позитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale – PANSS) [312]. В исследование были отобраны больные преимущественно с диагнозом параноидная шизофрения (код по МКБ-10 – F20.0, 44 человека), а также простая шизофрения (F20.6, 6 больных). Из 44 больных параноидной шизофренией 11 имели подтип F20.00 (непрерывное течение), 14 пациентов – F20.01 (эпизодический тип течения с нарастающим дефектом), 11 больных – F20.02 (эпизодический тип течения со стабильным дефектом), и 8 пациентов – F20.09 (неясный тип течения, период наблюдения до года). Основные клинические характеристики больных, включенных в исследование, указаны в Таблице 2. Согласно анамнестическим и лабораторным данным все включенные в исследование лица не имели признаков аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Для забора крови использовали пробирки типа Vacuette с активатором свертывания. Для удаления форменных элементов и получения сыворотки пробирки с кровью центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин в центрифуге с охлаждением Digicen 21 R (*Orto Alresa*, Испания). Полученная сыворотка до начала работы хранилась при температуре -70°C в низкотемпературном холодильнике MDF-U4186S (*Sanyo*, Япония).

В некоторых экспериментах в качестве группы сравнения использовались препараты IgG больных рассеянным склерозом (РС) и системной красной волчанкой (СКВ). Образцы сыворотки крови больных РС и СКВ предоставлены Областным центром неврологии и нейрохирургии Новосибирской областной больницы (Новосибирск), Отделением неврологии и нейрореабилитации КрасГМУ (Красноярск), а также Неврологической

клиникой на базе кафедры неврологии и нейрохирургии СибГМУ (Томск). Выделение IgG больных РС и СКВ проводили аналогично выделению антител больных шизофренией.

**Таблица 2.** Усредненные клинические данные больных шизофренией, включенных в исследование.

Число пациентов, чел	Диагноз	Пол	Возраст, годы	Длит. заб-я, годы	Баллы по шкале позитивных и негативных синдромов (PANSS)*				
					Позит. симпт. $\alpha$ 1	Негат. симпт. $\beta$ 2	Композит. индекс $\gamma$ индекс $\gamma$	Общая симпт. $\Delta$ 3	Сумм. балл $\epsilon$ $\Sigma 1+2+3$
<b>Пациенты с ведущей позитивной симптоматикой</b>									
22	F20.00 – 6 чел; F20.01 – 11 чел; F20.02 – 1 чел; F20.09 – 2 чел; F20.6 – 2 чел	11М:11Ж	41,2 ± 11,3	15,0 ± 9,1	25,2 ± 8,3	17,1 ± 7,3	4,2 ± 7,0	40,5 ± 12,6	82,2 ± 25,6
<b>Пациенты с ведущей негативной симптоматикой</b>									
28	F20.00 – 5 чел; F20.01 – 3 чел; F20.02 – 10 чел; F20.09 – 6 чел; F20.6 – 4 чел	10М:18Ж	37,0 ± 9,5	12,9 ± 7,8	19,1 ± 5,6	26,9 ± 5,1	-7,8 ± 6,7	36,3 ± 8,9	68,6 ± 15,7
<b>Средние значения по всем группам пациентов</b>									
50	F20.00 – 11 чел; F20.01 – 14 чел; F20.02 – 11 чел; F20.09 – 8 чел; F20.6 – 6 чел	21М:29Ж	38,8 ± 10,4	13,8 ± 8,4	21,6 ± 7,9	23,4 ± 6,1	-0,9 ± 7,6	38,1 ± 10,7	74,5 ± 21,4

\* Шкала PANSS позволяет проводить стандартизованную оценку различных векторов психопатологической симптоматики шизофрении, определять клинический профиль больного и проследить динамику состояния в процессе терапии. Каждый из симптомов оценивали в баллах [312].

$\alpha$  Шкала позитивных (продуктивных) синдромов оценивает признаки, которые избыточны по отношению к нормальному психическому статусу, включает в себя такие симптомы как бред, расстройства мышления, галлюцинации, возбуждение, идеи величия, подозрительность и идеи преследования, враждебность.

$\beta$  Шкала негативных синдромов оценивает признаки, недостаточные для нормального психического статуса, включает в себя симптомы, такие как снижение эмоциональности, эмоциональная отгороженность, трудность в общении, снижение инициативности, нарушение абстрактного мышления, нарушение спонтанности и плавности речи, стереотипное мышление.

$\gamma$  Композитный индекс – разница между баллами по шкале позитивных симптомов и баллами по шкале негативных симптомов, показывает превалирующую симптоматику.

$\Delta$  Шкала общих психопатологических синдромов оценивает тяжесть шизофренического расстройства в целом, включает в себя такие симптомы, как соматическая озабоченность (жалобы на физическое здоровье), тревога, чувство вины, напряженность, манерность и позирование, депрессия, моторная заторможенность, малообщительность, наличие эксцентричных мыслей, дезориентированность, нарушение внимания, расстройство воли, импульсивность, агрессивность и другие.

$\epsilon$  Суммарный балл – сумма баллов по шкалам позитивных симптомов, негативных симптомов и общей психопатологической симптоматики.

## 2.2. Материалы и оборудование

В настоящей работе использованы следующие реактивы: трис-гидроксиметил-аминометан (Tris), глицин, этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль (ЭДТА), NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NaHPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KHP0<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, акриламид, бисакриламид, мочеви́на (*MP Biomedicals*, Германия); агароза, бромистый этидий, краситель бромфеноловый синий, краситель ксиленцианол, Тритон X-100, додецилсульфат натрия, цитрат натрия, дитиотреитол (ДТТ), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (*Хеликон*, Россия); окрашенные маркеры молекулярной массы белков PageRuler Plus 10-250 кДа, неокрашенные маркеры молекулярной массы белков PageRuler 10-250 кДа (*Thermo Scientific*, США); диэтилпирокарибонат (*Amresco*, США); NaOH, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, уксусная кислота, изопропанол, бутанол-1, этанол (*Реахим*, Россия); Coomassie brilliant blue R-250 (*Fluka*, США).

В работе применялись следующие хроматографические сорбенты и расходные материалы: Protein G-Sepharose, Protein A-Sepharose, Superdex-200 HR, CM-trisacryl (*GE Healthcare*, Германия); Nucleosil 100-5 C18 Nautilus (*Macherey-Nagel*, Германия); Chelex-100 (*Bio-Rad*, США); пластинки для тонкослойной хроматографии с силикагелем 60 F<sub>254</sub> (*Merck*, Германия); Millipore Durapore 0,22 мкм, целлюлозные диализные мембраны, амиконы Vivaspin 500 10 кДа, амиконы Ultracel-3K 3 кДа, поливинилдендифторидная мембрана (PVDF) (*Sigma-Aldrich*, США); планшеты для ИФА (*Хеликон*, Россия).

Работы проводились на следующем оборудовании: хроматографические системы Akta Purifier и ÄKTA Start (*GE Healthcare*, Швеция), Breeze 2 (*Waters*, США); система гель документации Gel Doc XR+, источник питания PowerPac HV (*Bio-Rad*, США); термостат «Гном» (*ДНК-технология*, Россия); спектрофотометр Genesys 10S Bio UV/Vis, спектрофотометр NanoDrop 2000, планшетный спектрофотометр LabSystems Multiskan FC (*Thermo Scientific*, США), спектрофотометр BioPhotometer plus, ротационный испаритель Concentrator plus (*Eppendorf*, США), спектрофлюориметр Varian Cary 50 UV-VIS (*Agilent*, США); планшетный спектрофотометр Uniscan II (*Labsystems*, Финляндия); лазерный сканер Turbophoon FLA 9500 (*GE Healthcare*, США); система очистки воды Simplicity (*Millipore*, США); pH-метр Sartorius PB11 (*Sartorius*, Германия), центрифуга с охлаждением Digicen 21 R (*Orto Alresa*, Испания), низкотемпературный холодильник MDF-U4186S (*Sanyo*, Япония). Масс-спектрометрический анализ белков проводился при сотрудничестве с ТИБОХ ДВО РАН с использованием системы Reflex III (*Bruker*, Германия), оснащенной азотным лазером 337 нм VSL-337 ND (*Laser Science*, США).

## 2.2.1. Ферменты, субстраты и ингибиторы

В ряде экспериментов использовались следующие ферменты: РНКаза А, щелочная фосфатаза FastAP (*Thermo Scientific*, США), РНКаза Т1 (любезно предоставлена к.х.н. Воробьевой М.А.); пероксидаза хрена, папаин (*Sigma-Aldrich*, США).

В качестве *субстратов* в ферментативных реакциях, в том числе и в реакциях с каталитическими антителами, использовались следующие 23 соединения: пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид (ДАБ), ДНК тимуса теленка, суммарная дрожжевая РНК, полицитидиловая кислота (poly (C)), полиадениловая кислота (poly (A)), циклический цитидинмонофосфат (cCMP), АТР, 4,6-этилиден(G7)-n-нитрофенил-(G1)- $\alpha$ ,D-мальтогептозид, суммарные гистоны (H1, H2a, H2b, H3, H4) из тимуса теленка, основной белок миелина (ОБМ), человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), бычий сывороточный альбумин (БСА), лизоцим (*Sigma-Aldrich*, США); ДНК плазида pBluescript, лактоферрин молока человека (любезно предоставлены Седых С.Е., ИХБФМ СО РАН); гомо- и гетероолигорибонуклеотиды, меченые флуоресцеин-5-изотиоционатом (FITC) по 5'-положению (Таблица 3). Олигорибонуклеотиды синтезированы к.х.н. Мещаниновой М.И. методом твердофазного синтеза на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе фирмы БИОССЕТ (Россия) в лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН.

**Таблица 3.** Список 5'- FITC-меченых олигорибонуклеотидов, использованных в работе.

Название	Сиквенс	Число нуклеотидов
hsa-miR-137 (miR-137)	5'- FITC-UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	23
hsa-miR-9-5p (miR-9-5p)	5'- FITC-UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
hsa-miR-219a-2-3p (miR-219a-2-3p)	5'- FITC-AGAAUUGUGGCUGGACAUCUGU	22
hsa-miR-219a-5p (miR-219a-5p)	5'- FITC-UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU	21
r(pC) <sub>23</sub>	5'- FITC-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	23
r(pU) <sub>23</sub>	5'- FITC-UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	23
r(pA) <sub>23</sub>	5'- FITC-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	23

В некоторых экспериментах использовались ингибиторы, указанные в Таблице 3. Соединения 1–6 были производства *MP Biomedicals* (Германия), соединения 7–8 - *Sigma-Aldrich* (США).

**Таблица 4.** Список ингибиторов ферментов, используемых в работе.

№	Полное название	Сокращенное название	Тип ингибитора
1	Этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль	ЭДТА	Ингибитор металл-зависимых ферментов
2	Фенилметилсульфонил фторид	PMSF	Неспецифический ингибитор сериновых протеаз
3	4-(2-аминоэтил) бензенсульфонилфторид гидрохлорид	AЕBSF	Необратимый ингибитор сериновых протеаз
4	I-ацетамид	I-AC	Алкилирующий реагент, ингибитор цистеиновых (тиоловых) протеаз
5	Гексапептид (Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta)	Peprstatin A	Ингибитор кислых протеаз (аспартил пептидаз) бактериального происхождения
6	Гидрохлорид N - [(2S, 3R) - 3-амино-2-гидрокси-4-фенилбутирил] -L-лейцина	BESTATIN	Конкурентный обратимый ингибитор экзопептидаз, в том числе лейцинаминопептидазы и аминопептидазы В
7	$\alpha$ 1-антитрипсин	$\alpha$ 1-АТ	Белок человека из суперсемейства серпинов, ковалентный ингибитор сериновых протеаз
8	Апротинин	Апротинин	Белок человека с доменом Kunitz-типа, конкурентный ингибитор сериновых протеаз

## 2.3. Методы исследования

### 2.3.1. Выделение иммуноглобулинов G из сыворотки крови

IgG получали аффинной хроматографией на хроматографе ÄKTA Start (*GE Healthcare*) аналогично опубликованным ранее работам [224, 226, 313]. Сыворотку крови пациентов и здоровых доноров (2 мл) размораживали, разбавляли в четыре раза Буфером А, состоящим из 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 7,5 и 150 мМ NaCl, затем наносили на колонку с Protein-G-Sepharose (объемом 1 или 5 мл), предварительно уравновешенную тем же буфером. Белки, не взаимодействующие с сорбентом, отмывали Буфером А до полного исчезновения оптической плотности при  $\lambda = 280$  нм. Неспецифически адсорбированные белки и липиды элюировали буфером А, содержащим 1% Triton X-100, затем колонку промывали буфером А до исчезновения оптической плотности элюата. IgG элюировали 100 мМ Gly-НСl буфером, рН 2,6. В некоторых случаях IgG дополнительно очищали гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 HR 10/30. Полученные фракции антител (АТ) сразу после выхода с колонки нейтрализовали 1 М буфером Трис-НСl, рН 8,8, затем диализовали против буфера, необходимого для дальнейшей работы. Полученные белки были элетрофоретически гомогенны (см. п. 2.2.4.1).

### 2.3.2. Определение концентрации IgG спектрофотометрическим методом

Концентрацию IgG в выделенных препаратах определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf, США) при  $\lambda = 280$  нм с использованием коэффициента молярной экстинкции для IgG  $\epsilon=210\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  [314]. Концентрация представлена в мг/мл или нМ IgG.

### 2.3.3. MALDI масс-спектрометрический анализ антител

Исследование проводили при сотрудничестве с ТИБОХ ДВО РАН. IgG анализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (положительный режим) с использованием системы Reflex III (*Bruker*, Германия), оснащенной азотным лазером 337 нм VSL-337 ND (*Laser Science*, США), с длительностью импульса 3 нс. Насыщенный раствор синапиновой кислоты в смеси 0,1% ацетонитрила и трифторуксусной кислоты (1:2) использовали в качестве матрицы. Для анализа антител использовали нативные препараты IgG (фракции IgG после гель-фильтрации) и те же препараты после обработки ДТТ (0,01 М) в течение 10 минут при 90°C. К 1 мл реакционной смеси, содержащей интактные или обработанные IgG, добавляли 1 мл раствора, содержащего матрицу.



Конечная смесь была нанесена на пластину MALDI AnchorChip (*Bruker Daltonic*, Германия), высушена на воздухе и использована для анализа. Калибровку масс-спектров проводили с использованием белковых стандартов I и II (*Bruker Daltonic*, Германия) в режиме внешней и внутренней калибровки.

#### 2.3.4. Доказательства принадлежности каталитической активности иммуноглобулинам

Для того чтобы доказать, что изучаемая активность является неотъемлемым свойством иммуноглобулинов использовали ряд общепринятых жестких критериев [156], указанных далее. Кроме того, во всех экспериментах использовали пропущенные через фильтр (0,2 мкм) растворы и стерилизованную посуду, чтобы исключить контаминацию.

##### 2.3.4.1. Электрофоретический анализ гомогенности IgG

Электрофоретический анализ белков проводили по методу Леммли [315] в градиентном 4–15 % ПААГ, содержащем SDS. Концентрирующий гель содержал 4% акриламид (соотношение акриламид:бисакриламид – 30:1), 125 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 0,1% SDS; разделяющий гель – 4–15 % акриламида, 375 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 0,5 % SDS. Белковые препараты кипятили при 100°C в течение 3 мин в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 2 % SDS, 10 % глицерин, 0,025 % бромфеноловый синий, после чего наносили на гель и проводили электрофорез при напряжении 120 В. В дальнейшем белки окрашивали Coomassie Blue R-250 [316] или коллоидным серебром [317], затем детектировали результат в системе гель документации Gel Doc XR+ (*Bio-Rad*, США).

##### 2.3.4.2. Гель-фильтрация IgG в кислых условиях

Полученные аффинной хроматографией на Protein-G-Sepharose препараты IgG (0,2 мл, 2 мг/мл) выдерживали в 50 мМ Gly-НСl, рН 2,6 при 25°C в течение 30 мин для разрушения нековалентных белковых комплексов. После проводили гель-фильтрацию на колонке Superdex-200 HR 10/30 (23 мл), предварительно уравновешенной 10 мМ Gly-НСl рН 2,6 на хроматографе Akta Purifier (*GE Healthcare*, Швеция) при  $\lambda = 280$  нм. Белки элюировали тем же буфером со скоростью 0,2 мл/мин. Полученные фракции собирали в пробирки, нейтрализовали с помощью 1 М Трис-НСl, рН 8,8 и диализовали в течение 12 ч при 4°C против 100 объемов буфера, необходимого для дальнейших экспериментов (в зависимости от определяемой активности). После диализа во всех фракциях оценивали каталитическую активность IgG соответствующим методом (см. п. 2.3.2., 2.4.3, 2.4.6).

### 2.3.4.3. Определение каталитической активности *in-situ* в геле

Каталитическую активность *in-situ* в геле, в зависимости от анализируемой активности, определяли двумя методами. В случаях, когда условия реакции позволяют сополимеризовать субстрат в геле, определяли каталитическую активность *in-situ* в геле, содержащем субстрат (ДНК или РНК – в случае определения ДНК- и РНК-гидролизующей активности). Определение ДНК- и РНК-гидролизующей активности *in-situ* в геле проводили в градиентном 4–18% ПААГ, содержащем 0,1% SDS и сополимеризованную ДНК тимуса теленка (5 мкг/мл), либо РНК дрожжей (40 мкг/мл) в соответствии с работами [318, 221, 209]. После электрофореза для восстановления нативной конформации белки отмывали от SDS в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5; 0,1% Тритон X-100; 4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,2 мМ CaCl<sub>2</sub> в течение 3–4 ч при 25°C, а также тем же буфером, не содержащим Тритон X-100 (5 смен буфера). Для проявления каталитической активности гель инкубировали в 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, содержащем 4 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,2 мМ CaCl<sub>2</sub> в течение 15–48 ч при 37°C. Для визуализации продуктов реакции гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Каталитическую активность *in-situ* оценивали по исчезновению окраски геля бромистым этидием в областях, в которых произошел гидролиз субстрата.

В другом варианте, когда условия реакции не позволяли сополимеризовать субстрат в геле, каталитическую активность *in-situ* в геле определяли во фракциях, полученных после экстракции белков из полосок геля [286, 287]. Для этого после электрофореза в градиентном 4–18% ПААГ в присутствии 0,1% SDS, гель отмывали от SDS раствором 4 М мочевины в течение 1 ч при 25°C, затем milliQ H<sub>2</sub>O (10 смен по 5–7 мин). Затем гель промывали 50 мМ Na-фосфатным буфером, рН 7,0. В случае анализа ДНКазной и гистон-гидролизующей активности IgG использовали 50 мМ Tris-НСl буфер, рН 7,5. После отмывки гель разрезали на поперечные полоски (размером 2–3×10 мм), помещали каждую полоску в отдельную пробирку и размельчали, затем добавляли по 50 мкл 50 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,0), либо 50 мМ Tris-НСl рН 7,5 и инкубировали в течение пяти дней при 4°C для экстракции белков из полосок геля и восстановления нативной структуры. После экстракции пробирки центрифугировали 3 мин при 13,4 об/мин, надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки. Полученные элюаты использовали для определения каталитической активности IgG (см. п. 2.3.1, 2.3.2, 2.4.3, 2.4.4).

Во всех случаях для точной идентификации положения белков после 4–15 % SDS-PAGE одну половину геля использовали для анализа каталитической активности *in-situ*, а вторую окрашивали Coomassie Blue R-250 или коллоидным серебром.

## 2.4. Методы исследования окислительно-восстановительных активностей антител

### 2.4.1. Определение пероксидазной и оксидоредуктазной активностей IgG

Активности IgG изучали по окислению хромогенного субстрата 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) в присутствии  $H_2O_2$  (пероксидазная активность) и в отсутствие  $H_2O_2$  (оксидоредуктазная активность) [286, 287]. Для анализа пероксидазной активности реакционная смесь объемом 100–200 мкл содержала: 25 мМ К-фосфатный буфер pH 6,8, 0,77 мМ (0,2 мг/мл) ДАБ, 10 мМ  $H_2O_2$  и 70–670 нМ IgG. Оксидоредуктазную ( $H_2O_2$ -независимую) активность IgG анализировали с использованием такой же реакционной смеси, не содержащей  $H_2O_2$ . Реакционную смесь инкубировали в ячейках 96-луночных полистирольных иммунологических планшетов с плоским дном в темноте при 25°C в течение 15 мин, измеряя количество образовавшегося окрашенного продукта через каждые 30–120 сек. Анализ оптической плотности растворов проводили при  $\lambda = 450$  нм на спектрофотометре Labsystems Uniskan II (*Labsystems*, Финляндия). Реакционные смеси, не содержащие IgG, использовали как контрольные. По наклонам линейных участков кинетических кривых определяли начальные скорости реакции с помощью программы Origin 8.5 с использованием антител в концентрациях, соответствующих участкам линейной зависимости скорости каталитической реакции от концентрации IgG. Активность выражали в единицах  $A_{450}/\text{мин}/\text{мг}$  IgG или в  $M/\text{мин}/\text{мг}$  IgG с использованием коэффициента молярной экстинкции окисленного продукта ДАБ  $\varepsilon = 2807 M^{-1} \text{ см}^{-1}$ . В конечном итоге рассчитывали кажущиеся значения констант скоростей ( $k_{\text{cat}}$ ) при фиксированной концентрации ДАБ (0,77 мМ) по формуле  $k_{\text{cat}} = V (M/\text{мин})/[IgG] (M)$ .

### 2.4.2. Определение каталазной активности IgG

Каталазную активность IgG определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре Varian Cary 50 UV-Vis (*Agilent*, США) по уменьшению оптической плотности с течением времени, вызванному расщеплением пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) при добавлении исследуемого образца [319]. В среду инкубации, содержащую 30 мМ  $H_2O_2$  в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,0, добавляли 4–84 мкг/мл (28–560 нМ) IgG и регистрировали уменьшение оптической плотности при  $\lambda = 240$  нм в течение 5–10 минут при 25°C. При расчете каталазной активности IgG исходили из значения коэффициента молярной экстинкции  $H_2O_2$   $\varepsilon = 0,081 M^{-1} \text{ см}^{-1}$  [320]. Активность выражали в единицах  $mM H_2O_2/\text{мин}/\text{мг}$  IgG.

Влияние ионов металлов на каталазную активность IgG анализировали после интенсивного диализа против 20 мМ Na-фосфатного буфера pH 7,0, содержащего 0,1 М ЭДТА, в течение 24 ч при 4°C, затем трижды против 20 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,0 в течение семи часов. Все стадии диализа выполняли в сосудах, содержащих мешок для диализа с 5 мл хелатирующего агента Chelex 100. IgG, диализированные против ЭДТА, подвергали второму диализу аналогично первому диализу, но против 20 мМ раствора Na-фосфатного буфера, который пропускали через 5-мл колонки Chelex 100. Таким образом добивались удаления связанных ионов металлов с молекулой IgG.

Для исследования влияния ионов металлов ( $Me^{2+}$ ) в реакционные смеси добавляли соли  $CuCl_2$ ,  $FeSO_4$ ,  $MnCl_2$ ,  $NiCl_2$ ,  $CoCl_2$  и  $ZnCl_2$  (каждую в концентрации 0,1–5,0 мМ) в случае диализированных и недиализированных IgG. Относительную активность в присутствии ионов  $Me^{2+}$  анализировали, как описано выше с использованием стандартной реакционной смеси. Активность диализированных антител сравнивали с активностями не диализированных IgG. В случае анализа эффекта  $Me^{2+}$  контрольные смеси содержали соответствующие соли в требуемых концентрациях.

Термическую стабильность IgG анализировали путем предварительной инкубации антител (1,8 мг/мл) в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0 в течение 10 минут при различных температурах (25–100°C), а затем отбирали аликвоты по 5 мкл и добавляли их к 100 мкл стандартной реакционной смеси для определения каталазной активности.

Зависимость от pH анализировали с использованием различных буферных систем (20 мМ): Na-цитрат-фосфатная (pH 4,0–6,0), Na-фосфатная (pH 6,0–8,0), Трис-HCl (pH 8,0–9,5).

Анализ кинетических параметров каталазной реакции, катализируемой АТ, проводили при стандартных условиях при концентрации  $H_2O_2$  от 3 до 33 мМ. Кажущиеся значения кинетических констант рассчитаны с использованием программного обеспечения Origin 9.0 (*OriginLab Corporation*, США) и представлены в виде графика Лайнуивера-Берка [321, 322]. Для каждой точки проводили не менее двух измерений.

## 2.5. Методы исследования гидролитических активностей антител

### 2.5.1. Определение олигосахарид-гидролизующей активности антител

Для изучения полисахарид-гидролизующей (амилазной) активности IgG реакционную смесь объемом 15 мкл, содержащую 30 мМ Трис-НСl pH 7,5, 1,5 мМ 4,6-этилиден(G7)-п-нитрофенил-(G1)- $\alpha$ , D-мальтогептозид и 0,1–0,2 мг/мл (0,67–1,34 мМ) IgG, инкубировали 48 ч в термостате при 37°C согласно [323]. Для анализа продуктов гидролиза использовали метод восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах Kieselgel F<sub>254</sub> с алюминиевой подложкой (*Merck*, США) в системе: уксусная кислота: бутанол-1: вода (1:3:1). Пластины высушивали, затем обрабатывали раствором, состоящим из 12,5% концентрированной серной кислоты и 87,5% изопропилового спирта. Для визуализации продуктов гидролиза пластины сушили над нагревателем, а затем сканировали. Активность антител оценивали в процентах по убыли исходного олигосахарида с учетом всех его гидролизованных форм.

### 2.5.2. Определение АТФ-гидролизующей активности IgG

Реакционные смеси (10 мкл) для изучения АТФазной активности IgG содержали 50 мМ Трис-НСl pH 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ АТФ и 0,2–0,4 мг/мл (1,34–2,68 мМ) антител согласно работам [324, 291]. Реакционные смеси инкубировали в течение 24 ч в термостате при 37°C. Продукты гидролиза анализировали методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах силикагеля Kieselgel F254 (*Merck*, США) в системе: диоксан: 10% NH<sub>4</sub>ОН: вода (6: 1: 4). После высушивания пластин продукты гидролиза идентифицировались по поглощению исходного АТФ и его продуктов в ультрафиолетовом свете. Степень гидролиза определяли по переходу АТФ в гидролизованные формы в программе Image Quant V 5.2.

### 2.5.3. Определение ДНК-гидролизующей активности антител

ДНК-гидролизующую активность IgG определяли по глубине гидролиза суперскрученной ДНК плазмиды pBluescript (молекулярная масса 2,95 кДа) [318, 291]. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 20 мМ Трис-НСl pH 7,5, 18 мкг/мл (6,1 нМ) ДНК плазмиды pBluescript, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, а также 0,005–0,2 мг/мл (0,033–1,3 мкМ) IgG. После инкубации при 37°C в течение 0,5–10 ч (стандартное время 2 ч) в

зависимости от активности препарата IgG к реакционной смеси добавляли по 2,5 мкл буфера для нанесения (4X), содержащего 30% глицерин, 20 mM ЭДТА, pH 8,0, 1% SDS и 0,005% бромфеноловый синий. Анализ продуктов гидролиза проводили в 0,8% агарозном геле с окраской бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Результаты регистрировали в системе гелевой документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Обсчет проводили с помощью программ ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, США) и Image Lab 6.0 (Bio-Rad, США). При оценке глубины протекания реакции учитывали превращение суперскрученной формы ДНК плазмиды pBluescript в кольцевую и линейную формы. Все измерения (начальные скорости реакций) проводили в условиях линейной зависимости от времени инкубации и концентрации IgG (15–40% гидролиза). За 100% активности принимали полный переход суперскрученной плазмиды в никированную. Если активность была низкой (менее 5–10% гидролиза), инкубацию продлевали до 2–10 ч, в зависимости от образца. Если гидролиз суперскрученной ДНК через 1–2 ч инкубации превышал 50%, концентрация IgG снижали в 2–100 раз, в зависимости от образца. Конечный результат представляли в единицах относительной ДНКазной активности (%) нормированной на стандартные условия (667 нМ IgG, 1 ч инкубации).

Для анализа кинетических параметров реакции гидролиза реакционные смеси содержали стандартные компоненты и 4–200 нМ ДНК плазмиды. Кажущиеся значения  $K_m$  и  $V_{max}$  ( $k_{cat}$ ) рассчитаны с помощью нелинейной аппроксимации методом наименьших квадратов с использованием программного обеспечения Origin 9.0 (OriginLab Corporation, США) и представлены в виде графика Лайнуивера-Берка [321, 322]. Для каждой точки проводили как минимум три независимых эксперимента.

#### 2.5.4. Определение РНК-гидролизующей активности антител

РНКазную активность IgG определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf, США), как описано ранее [208, 209, 221]. Реакционные смеси объемом 0,35 мл содержали 50 mM HEPES, pH 7,5 (или 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, в случае poly(C)), а также один из субстратов: 1 mM cCMP, 50 мкг/мл poly(C) или poly(A), 50 мкг/мл суммарной дрожжевой РНК. В реакционную смесь добавляли IgG до конечной концентрации 0,05–0,2 мг/мл (0,33–1,34 мкМ) и регистрировали увеличение оптической плотности при  $\lambda = 250$  нм при использовании poly(C) ( $\epsilon = 2380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) в качестве субстрата [325], при  $\lambda = 292$  нм в случае cCMP ( $\epsilon = 730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [326], или при  $\lambda = 282$  нм в случае суммарной РНК дрожжей ( $\epsilon = 829 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [209, 327, 328]. При использовании poly(A) в качестве субстрата регистрировали уменьшение оптической плотности при  $\lambda = 282$  нм ( $\epsilon = 829 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [209, 327, 328]. В

контрольные смеси вместо IgG добавляли соответствующий объем буфера, в котором находились АТ. По наклону кинетических кривых определяли начальную скорость реакции гидролиза. Конечный результат представляли в единицах: ОЕ/мин/мг IgG, где ОЕ – единицы оптической плотности. Для изучения влияния ионной силы раствора на РНКазную активность использовали NaCl в концентрации 10–300 мМ. Исследование влияния ионов металлов в диапазоне концентраций 5–50 мМ на РНК-гидролизующую активность антител проводили аналогичным образом. В контрольные смеси, не содержащие АТ, добавляли соли металлов в соответствующей концентрации.

### 2.5.5. Определение микроРНК-гидролизующей активности антител

В качестве субстратов использовали четыре 5'-флуоресцентно меченных микроРНК, а также три олигорибонуклеотида, указанные в Таблице 3. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 0,01 мг/мл микроРНК (1,34–1,58 мкМ в зависимости от микроРНК) и 0,1 мг/мл (0,67 мМ) IgG [223]. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 37°C. После инкубации добавляли 10 мкл денатурирующего буфера, состоящего из 8 М Мочевины и 0,025% ксиленцианола. Для получения маркера (Ladder) и точной идентификации продуктов гидролиза использовали ограниченный щелочной гидролиз и статистический гидролиз РНКазой T1. Реакционная смесь при щелочном гидролизе содержала 0,05 М NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (бикарбонатный буфер) pH 9,5 и 0,2 мг/мл микроРНК. После инкубации 15 мин при 90°C реакционную смесь охлаждали и добавляли в нее объем денатурирующего буфера, равный объему реакционной смеси. Реакционная смесь при статистическом гидролизе РНКазой T1 содержала T1 буфер с краской (25 мМ цитрат Na pH 5,0, 1 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 7 М Мочевина, 0,025% ксиленцианол и 0,025% бромфеноловый синий в 8 М мочеvine), 0,01 мг/мл микроРНК, 0,33 мг/мл tRNA *E.Coli*, 1 U/мл РНКазы T1 (Fermentas, США). Перед добавлением РНКазы T1 реакционную смесь инкубировали 15 мин при 55°C для денатурации РНК и перехода ее в линейную форму. После предварительной инкубации добавляли РНКазу T1 и инкубировали 15 мин при 55°C. После проведения реакции добавляли TBE 10X буфер до концентрации 2X (состав буфера TBE: 1М Tris, 1М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,02 М Na<sub>2</sub>ЭДТА). Продукты гидролиза анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (20% акриламид (30:1), 8 М мочеvine, 1X TBE pH 8,3) при 800 V и 40 mA в течение 3 ч. Результаты электрофореза регистрировали на лазерном сканере Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare, США).

Поскольку при статистическом щелочном гидролизе образуются циклические 3'-монофосфатные продукты, которые обладают меньшей подвижностью при электрофорезе и поэтому дают дополнительные полосы, для более точной идентификации всех продуктов гидролиза в некоторых случаях их обрабатывали FastAP термочувствительной щелочной фосфатазой (Thermo Scientific, США). Для этого после 1 ч инкубации при 37°C в случае с IgG, или 15 мин при 90°C в случае Ladder, в реакционную смесь объемом 10 мкл добавляли по 1 мкл 10X FastAP буфера до концентрации 1X (состав буфера 10X FastAP: 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 М KCl, 0.2% Triton X-100, 1 мг/мл БСА), а затем FastAP щелочную фосфатазу до концентрации 0,1 U/мкл. После 1 ч инкубации при 37°C щелочную фосфатазу инактивировали нагреванием до 75°C 5 мин, либо добавлением ЭДТА pH 7,5 до концентрации 50 мМ. Результаты анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях.

Для определения pH-зависимости использовались различные буферные системы при концентрации 50 мМ: MES буфер (pH 5,5–6,0), MOPS (pH 6,5–7,5), Tris-HCl (pH 8,0–8,5), Gly-NaOH (pH 9,0–10,5). Зависимость эффективности гидролиза микроРНК от присутствия ионов металлов исследовали путем добавления MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 40 мМ к интактным или диализованным против 50 мМ Tris-HCl буфера, pH 7,5, содержащего 50 мМ ЭДТА.

Для определения кинетических параметров реакции гидролиза микроРНК использовали следующие концентрации субстрата: 0,0075; 0,01; 0,015; 0,020; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 мг/мл. Определяли удельную активность по убыли субстрата в % в программе Image Quant, затем рассчитывали кинетические константы в программе Origin 9.0 (*OriginLab Corporation*, США) и строили графики в координатах Лайнуивера-Берка [322].

Для изучения зависимости РНКазной активности IgG от конформации субстрата, микроРНК предварительно нагревали выше температуры плавления (индивидуальна для каждой из микроРНК), а затем резко охлаждали до 0°C. Изучали микроРНК-гидролизующую активность через 5, 10, 15 мин инкубации с IgG в концентрации 0,2 мг/мл.

Для расчета термодинамически наиболее вероятных двумерных вторичных структур микроРНК с минимальной свободной энергией использовали Predict a Secondary Structure сервер (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>) [329]. Расчет трехмерных структур четырех микроРНК в растворе осуществляли с использованием SimRNAweb сервера (<http://genesilico.pl/SimRNAweb>) [330].



## 2.5.6. Определение протеолитической активности IgG в реакции гидролиза гистонов

В качестве субстрата для определения протеолитической активности IgG использовали препарат эквимольной смеси пяти гистонов (H1, H2a, H2b, H3, H4) (*Sigma-Aldrich*, США). Реакционная смесь объемом 10 мкл состояла из 20 мМ Tris-HCl pH 7,5, 1 мг/мл (46–89 мкМ, в зависимости от гистона) суммарного препарата гистонов, 0,1 мг/мл (0,67 мМ) IgG [254, 255, 256]. Инкубацию проводили при 37°C в течение 2–48,5 ч (стандартное время реакции – 20 ч). Реакцию останавливали добавлением краски для белкового фореа, содержащей SDS до концентрации 1X (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % глицерин, 0,025 % бромфеноловый синий). Продукты гидролиза гистонов анализировали в 15% ПААГ (32:1), содержащем SDS. Регистрацию продуктов проводили в системе гель документации Gel Doc XR+ (*Bio-Rad*, США) после окрашивания белков Coomassie Blue R-250 [316] или коллоидным серебром [317]. Относительную протеолитическую активность антител определяли по снижению интенсивности полос белка каждого из гистонов в программе Image Lab 6.0 (*Bio-Rad*, США).

Для анализа влияния ионов металлов на каталитическую активность к эквимольной смеси препаратов АТ, диализованных против 20 мМ Tris-HCl буфера pH 7,5, содержащего 50 мМ ЭДТА, добавляли CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 2 мМ. Влияние pH среды на активность оценивали в различных буферных системах при концентрации 50 мМ: MES буфер (pH 5,5–6,0), MOPS (pH 6,5–7,5), Tris-HCl (pH 8,0–8,5), Gly-NaOH (pH 9,0–10,5).

Для исследования субстратной специфичности препараты антител инкубировали в присутствии основного белка миелина (ОБМ), человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), бычьего сывороточного альбумина (БСА), лактоферрина молока человека, лизоцима в стандартных условиях (20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мг/мл белков-субстратов, 0,1 мг/мл IgG).

Исследование кинетических параметров проводили в 20 мМ Tris-HCl pH 7,5 при фиксированной концентрации IgG – 0,1 мг/мл (0,67 мМ) и следующих концентрациях суммарных гистонов: 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,8, 1, 1,5 мг/мл. Удельную активность рассчитывали в программе Image Quant по убыли субстрата в %, затем определяли кинетические константы с помощью нелинейной аппроксимации методом наименьших квадратов в программе Origin 9.0 (*OriginLab Corporation*, США) и представляли кинетические данные в координатах Лайнуивера-Берка [322].

Ингибиторный анализ применяли для определения типа протеолитической активности IgG. Использовали следующие ингибиторы протеаз, полное название и характеристики которых указаны в Таблице 4: ЭДТА (50 мМ), PMSF (1,5 мМ), AEBSF (1 мМ), I-ацетамид (1,5 мМ), BESTATIN (1 мМ), Pepstatin A (1 мМ).

### 2.5.7. Ингибирование протеолитической активности IgG под действием $\alpha$ 1-антитрипсина и апротинина

Исследование влияния  $\alpha$ 1-антитрипсина и апротинина на протеолитическую активность проводили с использованием эквимольной смеси суммарных гистонов 1 мг/мл (46–89 мкМ, в зависимости от гистона) в качестве субстрата. Характеристика используемых белковых ингибиторов приведена в Таблице 4. Реакционная смесь содержала 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 мг/мл (0,67 мМ) IgG, субстраты в указанных выше концентрациях, а также ингибиторы: 0,77–19,2 мкМ  $\alpha$ 1-антитрипсина или 6,1–154 мкМ апротинина. Реакционные смеси инкубировали 20 ч при 37°C, затем продукты гидролиза анализировали в 15% SDS-ПААГ (32:1) и регистрировали в системе гель документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США) после окраски Coomassie Blue R-250 [316]. Определяли ингибирование (%) каталитической активности IgG в присутствии ингибиторов, за 100% принимали активность без ингибиторов.

Аналогичным образом определяли полумаксимальную эффективную концентрацию ( $EC_{50}$ )  $\alpha$ 1-антитрипсина для ингибирования реакции гидролиза гистонов каталитическими IgG. Для этого использовали ингибитор в концентрации от 0,019 до 19,2 мкМ. Из полученных данных о зависимости степени ингибирования (%) каталитической активности IgG от концентрации  $\alpha$ 1-антитрипсина рассчитывали значения  $EC_{50}$  с помощью нелинейной аппроксимации методом наименьших квадратов с использованием пакета GNUPLOT, интегрированного в онлайн инструмент (<http://ic50.tk>).

## 2.6. Статистический анализ полученных данных

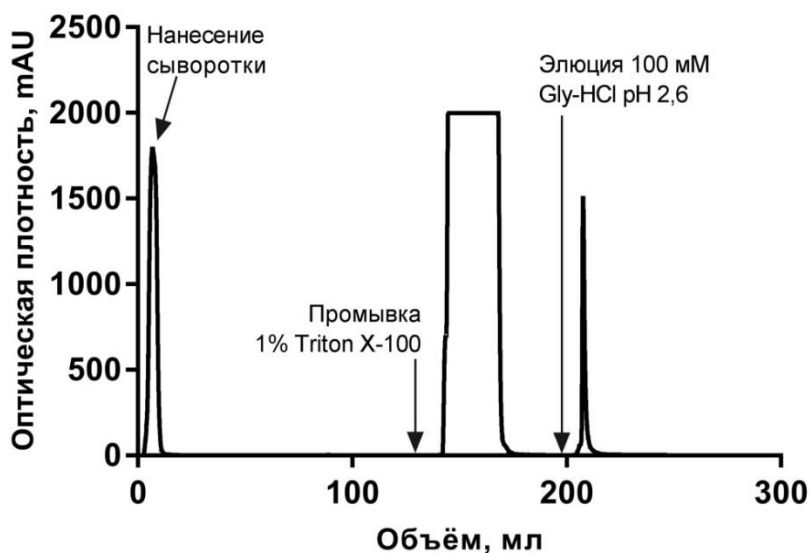
Статистический анализ проводили с использованием программного пакета STATISTICA 10 (StatSoft, США). Для проверки нормальности закона распределения полученных данных использовали W-критерий Шапиро–Уилка. Большинство серий сравниваемых параметров не соответствовало нормальному закону распределения. Поэтому для оценки различий между выборками использовали U-критерий Манна–Уитни, а также критерий Вальда–Вольфовица. Для определения значимости различий между несколькими группами использовали односторонний дисперсионный анализ Краскела —

Уоллиса. Различия между исследуемыми группам считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (в случае нормального закона распределения), а также медианны (Me) и интерквартильного интервала ( $Q_{25}$ – $Q_{75}$ ). Для корреляционного анализа в основном был применен непараметрический ранговый метод Спирмена. В случае, когда данные подчинялись нормальному закону распределения, использован параметрический метод Пирсона.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Выделение IgG больных шизофренией и здоровых доноров из сыворотки крови

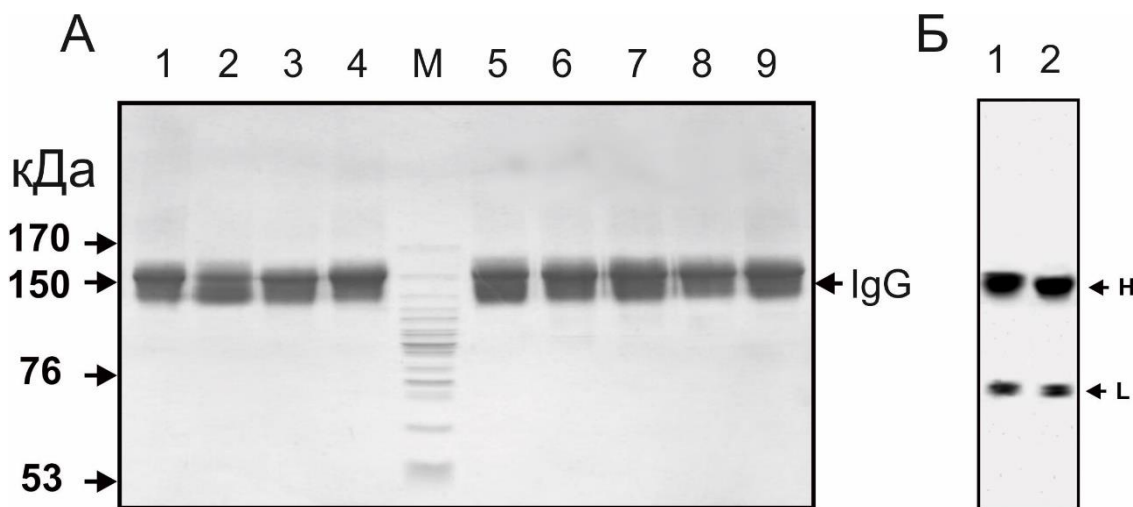
Иммуноглобулины являются главными эффекторами гуморальной иммунной системы. Для изучения различных свойств, в том числе каталитической активности, поликлональные IgG выделены индивидуально из сыворотки крови 50-ти больных шизофренией и 25-ти здоровых доноров методом аффинной хроматографии на колонке с Protein G-Sepharose. Ранее показано, что такой способ позволяет получить гомогенные препараты IgG без примесей других белков сыворотки крови [155, 302, 394].



**Рис. 2.** Профиль аффинной хроматографии сыворотки крови больного шизофренией на Protein G-Sepharose.

На Рис. 2 представлен типичный профиль аффинной хроматографии на колонке Protein G-Sepharose сыворотки крови больного шизофренией. Для избежания контаминации все растворы пропускали через фильтр Millipore Durapore (0,22 мкм) и использовали стерилизованную в сухожаровом шкафу посуду. Все полученные препараты поликлональных IgG, как больных шизофренией, так и здоровых доноров, имели схожие хроматографические профили и элюировались кислым буфером (рН 2,6) одним четким пиком. Фракции белков из центральной части данного пика собирали, объединяли и использовали для дальнейшего анализа. Чистота и гомогенность полученных фракций IgG для каждого полученного препарата проанализирована с помощью SDS-PAGE (Рис. 3). На электрофореграмме препараты IgG находятся в области 150 кДа (Рис. 3 А). При анализе

гомогенности в восстанавливающих условиях после окраски коллоидным серебром на электрофореграмме (Рис. 3 **Б**) выявлено только две полосы, которые соответствуют Н- и L-цепям IgG, никаких дополнительных полос белков не обнаружено.

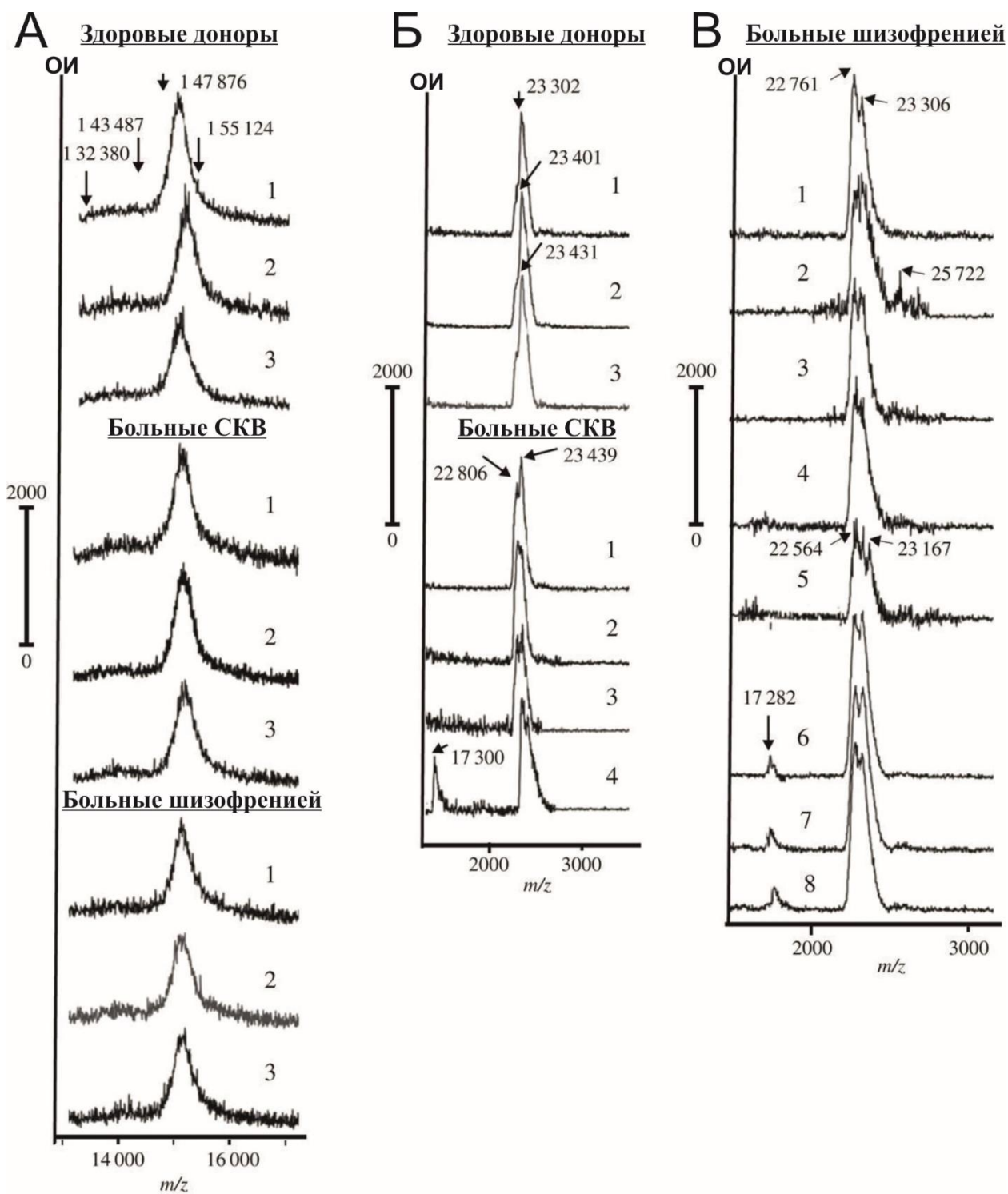


**Рис. 3.** Анализ гомогенности выделенных препаратов IgG в SDS-ПААГ. **А** – градиентный 4–18 % ПААГ электрофорез. Дорожки 1–3 – препараты IgG здоровых доноров, 4 – смесь препаратов IgG здоровых доноров, 5–8 – препараты IgG больных шизофренией, 9 – смесь препаратов IgG больных шизофренией, М – белковый маркер молекулярной массы. Окраска Coomassie R-250. **Б** – 12 % ПААГ электрофорез в восстанавливающих условиях (в присутствии ДТТ). Дорожка 1 – смесь препаратов IgG здоровых доноров, 2 – смесь препаратов IgG больных шизофренией. Окраска коллоидным серебром.

Таким образом, показано, что полученные препараты IgG являются гомогенными и не содержат примеси других белков. Однако, как известно, сывороточные IgG сильно различаются по аминокислотной последовательности и степени гликозилирования и соответственно по молекулярной массе [331]. Поэтому для более детальной оценки молекулярной массы полученных IgG далее использовали метод MALDI масс-спектрометрии.

### 3.2. MALDI масс-спектрометрический анализ антител больных шизофренией

Метод SDS-PAGE позволяет только приблизительно оценить молекулярную массу анализируемых молекул, а белки с сопоставимыми молекулярными массами образуют относительно широкие белковые полосы на электрофореграмме. Для точной оценки молекулярной массы полученных из сыворотки IgG использовалась MALDI-TOF масс-спектрометрия. Для сравнения в эксперимент также включены полученные тем же методом IgG больных системной красной волчанкой (СКВ), которая является классическим аутоиммунным заболеванием.



**Рис. 4.** MALDI-масс-спектры интактных IgG и их легких цепей. **А** – масс-спектры интактных IgG, выделенных из сыворотки крови здоровых доноров, больных системной красной волчанкой (СКВ) и больных шизофренией. **Б** – масс-спектры легких цепей IgG здоровых доноров и больных СКВ. **В** – масс-спектры легких цепей IgG больных шизофренией. Стрелками указаны значения молекулярной массы. ОИ – относительная интенсивность сигнала.

На рис. 4 **А** представлены типичные MALDI-TOF масс-спектры интактных IgG здоровых доноров, больных СКВ и шизофренией. Следует отметить, что масс-спектры интактных IgG в исследуемых группах очень похожи. Все спектры содержат множество

различных пиков однозарядных ионов  $\text{IgG}^+$  (гликозилированных в разной степени) с молекулярной массой приблизительно от 143 487 до 155 124 Да, образуя один широкий пик, соответствующий молекулярной массе примерно от 147 877 до 149 537 Да (Рис. 4 А). Таким образом, значительные отличия в масс-спектрах интактных  $\text{IgG}$  здоровых доноров и больных отсутствовали.

Для детального анализа спектров Н- и L-цепей молекулы  $\text{IgG}$  обработаны восстанавливающим дисульфидные связи агентом (ДТТ). Масс-спектры тяжелых цепей ( $\text{H}^+$ ) содержали два различных пика с сопоставимой интенсивностью, соответствующих молекулярным массам  $\sim 47,5\text{--}48,0$  и  $50,5\text{--}51,7$  кДа, но, аналогично спектрам интактных  $\text{IgG}$ , они не отличались у здоровых доноров и больных (данные не приведены).

Более информативными оказались спектры L-цепей  $\text{IgG}$  (Рис. 4 Б, В). Спектры L-цепей  $\text{IgG}$  всех 20 здоровых доноров были относительно гомогенными и характеризовались одним выраженным пиком, соответствующим молекулярной массе 23 300–23 400 Да, что согласуется с литературными данными [332]. На рис. 4 Б показаны три спектра, которые оказались сходными для всех исследуемых 20 здоровых доноров. В отличие от здоровых доноров, во всех спектрах L-цепей  $\text{IgG}$  больных СКВ наблюдался пик с двумя максимумами со сравнимыми интенсивностями сигнала (например,  $\text{IgG}$  № 1–4 больных СКВ; Рис. 4 Б). Эти пики характеризуются более низкими значениями молекулярной массы (22 806–23 000 Да) по сравнению с пиками L-цепей  $\text{IgG}$  здоровых доноров (23 302–23 431 Да) (Рис. 4 Б). Кроме того, MALDI-спектры L-цепей  $\text{IgG}$  пяти пациентов с СКВ содержали дополнительный ярко выраженный пик, соответствующий молекулярной массе 17 000–17 400 Да (например,  $\text{IgG}$  № 4; Рис. 4 Б). Интересно, что MALDI масс-спектры L-цепей  $\text{IgG}$  больных шизофренией оказались очень похожи на спектры L-цепей пациентов с СКВ и сильно отличались от спектров L-цепей здоровых доноров. Все масс-спектры L-цепей у 20 пациентов с шизофренией демонстрируют пик с по меньшей мере двумя максимумами, сопоставимыми по своей интенсивности (Рис. 4 В). Кроме того, у четырех из 20 пациентов с шизофренией отмечено наличие пика с тремя выраженными максимумами (например,  $\text{IgG}$  № 5; Рис. 4 В). Более того, подобно антителам при СКВ, четыре из 20 препаратов  $\text{IgG}$  больных шизофренией содержали L-цепи с молекулярной массой от 17 200 до 17 300 Да (например,  $\text{IgG}$  № 6–8; Рис. 4 В). Спектры легких цепей  $\text{IgG}$  у нескольких пациентов с шизофренией дополнительно характеризовались небольшими пиками, соответствующими молекулярной массе выше 23 300 Да (например, 25 722 Да, для  $\text{IgG}$  № 2, Рис. 4 В).

Из полученных данных очевидно, что масс-спектры L-цепей IgG здоровых доноров, пациентов с шизофренией и СКВ значительно отличаются. Однако наблюдаются некоторые сходства между спектрами L-цепей IgG больных шизофренией и СКВ. В целом, отличия в молекулярных массах могут быть связаны с различиями в изотопном составе, аминокислотной последовательности вариабельной области IgG, а также в паттернах посттрансляционных модификаций, в частности степени гликозилирования и сиаилирования молекул IgG [333]. Однако наиболее вероятное объяснение наблюдаемых различий связано с гетерогенностью длины фрагментов вариабельного участка антитела, связывающих специфический антиген (complementarity-determining regions, CDRs). Из шести известных CDRs (по три на каждой из цепей) наиболее вариабелен CDR3. Во время созревания лимфоцитов перестройка элементов последовательности V, D и J сегментов в генах иммуноглобулинов создает огромную степень разнообразия в CDR3 [334]. Вариации в конкретных используемых V, D и J сегментах, различные точки рекомбинации и случайное добавление нуклеотидов – все это приводит к значительной гетерогенности длины и последовательности CDR3. Случайное добавление нуклеотидов к последовательности катализирует терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза, которая является матрица-независимой ДНК-полимеразой. Важно отметить, что изменения числа кодонов в CDR3 связаны с аутоиммунными заболеваниями [335, 336]. В частности, у больных ревматоидным артритом обнаружено увеличение числа клонов В-клеток, с генами K-L-цепи, несущими 11 кодонов в CDR3, в то время как обычно CDR3 состоит из 6-10 кодонов [335]. Изменение длины CDR3 может быть связано с аномальной регуляцией генерируемого репертуара или с отбором В-лимфоцитов, несущих антитела с необычной длиной CDR3. Кроме того, вариации в степени гликозилирования и других посттрансляционных модификаций могут также увеличивать разнообразие молекулярных масс образующихся IgG. Известно, что различия в степени гликозилирования также связаны с воспалением и аутоиммунными нарушениями [337, 338]. Таким образом, обнаруженные различия в молекулярных массах L-цепей IgG у больных шизофренией могут быть связаны с аномалиями регуляции и образования иммуноглобулинов, характерных для некоторых аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Образование укороченного варианта L-цепи IgG с молекулярной массой 17,3 кДа может быть связано с нарушением процессов синтеза антител в плазматических клетках. Нарушение синтеза IgG и образование различных aberrantных форм L-цепей характерно для множественной миеломы, сопровождающейся амилоидозом [339, 340]. При этом происходят глубокие нарушения в процессах синтеза IgG. Образование L-цепей с массой 17,3 кДа при шизофрении и СКВ до настоящего времени не было описано в литературе.



Учитывая, что укороченный вариант L-цепи IgG в данном эксперименте обнаружен только у некоторых больных СКВ и шизофренией, можно предположить, что нарушение процессов синтеза характерно только для некоторых подгрупп пациентов. Наличие в сыворотке укороченных L-цепей IgG с молекулярной массой 17,3 кДа, как у некоторых больных шизофренией, так и у пациентов с СКВ, может указывать на некоторые общие механизмы нарушения генерации антител.

Изложенные выше результаты дополняют имеющиеся данные об иммунологических нарушениях при шизофрении. Однако неизвестно, какую роль могут играть IgG, имеющие различную молекулярную массу, в патогенезе шизофрении. Нельзя исключить, что при шизофрении среди пула всех IgG организма присутствуют также каталитически активные иммуноглобулины.

### **3.3. Анализ разнообразия каталитических активностей IgG при шизофрении**

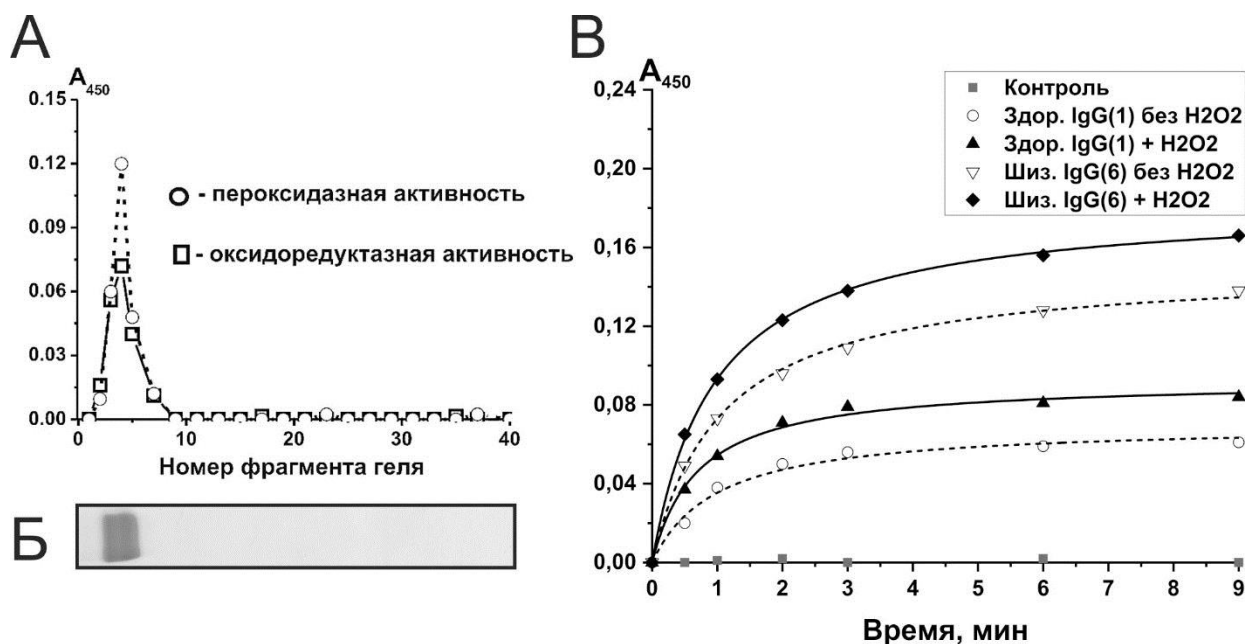
Каталитические антитела могут играть двойственную роль: в некоторых случаях они приводят к патологическим эффектам, в некоторых могут участвовать в защитных реакциях организма (см. Главу 1.2). Это хорошо иллюстрируется на примере ДНК-гидролизующих абзимов, которые с одной стороны могут быть цитотоксичными, а с другой защищать от вирусных инфекций [301]. При некоторых заболеваниях каталитические антитела могут гидролизовать функционально значимые молекулы, например, ОБМ при рассеянном склерозе [233], тем самым приводя к развитию патологии, при других – могут выполнять защитную функцию, путем гидролиза патологических белков, например,  $\beta$ -амилоида при болезни Альцгеймера [237]. Даже при одном заболевании каталитические антитела могут выполнять защитную роль, либо участвовать в патогенезе заболевания. Так при аутоиммунном тиреоидите гидролиз тиреоглобулина может приводить к дисфункции щитовидной железы, но в тоже время удаление тиреоглобулина из системного кровотока может снижать аутоиммунный ответ. Кроме того, при определенном заболевании каталитические антитела могут быть чрезвычайно гетерогенными как по субстратной специфичности, так и по уровню каталитической активности. Поэтому особенно важно изучать весь спектр каталитических активностей антител при определенном заболевании, чтобы выяснить их роль при данной патологии.

### 3.3.1. Исследование окислительно-восстановительных активностей IgG

Оксидативные нарушения являются неотъемлемой частью патологического процесса при шизофрении (см. Главу 1.1.5). Преобладание прооксидантных процессов и недостаточность антиоксидантной системы приводят к аномалиям миелинизации, гипофункции NMDA-рецепторов, гибели тормозных парвальбумин-экспрессирующих интернейронов и другим процессам, и тем самым способствуют развитию патологии. Недавно получены неожиданные результаты о способности иммуноглобулинов катализировать окислительно-восстановительные реакции. Показано, что поликлональные IgG здоровых доноров обладают пероксидазной и оксидоредуктазной активностью [286, 287]. Эти данные позволяют предположить, что каталитические антитела с окислительно-восстановительной активностью могут уменьшать патологические эффекты оксидативных нарушений и защищать организм от оксидативного стресса. Учитывая чрезвычайно важную роль оксидативного стресса при шизофрении, а также имеющиеся данные о протективных свойствах IgG, в данной работе исследована способность поликлональных IgG катализировать различные окислительно-восстановительные реакции.

#### 3.3.1.1. Пероксидазная и оксидоредуктазная активности антител

Ранее Толмачевой А.С. с соавторами показано, что небольшие фракции IgG и их фрагменты (F(ab)<sub>2</sub> и F<sub>ab</sub>) из сыворотки здоровых людей окисляют 3,3'-диаминобензидин (ДАБ) в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (пероксидазная активность) и в отсутствие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимая оксидоредуктазная активность) [286, 287]. Также пероксидазная и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимая оксидоредуктазная активности IgG обнаружены при рассеянном склерозе и системной красной волчанке [341]. Кроме того, данные активности выявлены у IgG здоровых крыс Wistar [342, 343, 344]. В данной работе впервые исследованы пероксидазная и оксидоредуктазная активности индивидуальных препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров с использованием ДАБ, который является известным модельным субстратом для различных пероксидаз.



**Рис. 5.** Анализ пероксидазной и оксидоредуктазной активности IgG больных шизофренией. **А, Б** – SDS-ПААГ анализ пероксидазной (o) и оксидоредуктазной (□) активностей IgG (20 мкг). После разделения IgG в градиентном 4–18% ПААГ, белки из различных фрагментов геля экстрагировали и выдерживали в специальных условиях для ренатурации IgG, затем определяли относительную активность в полученных экстрактах с помощью стандартных методов (**А**). Вторая полоса этого же геля использована для определения положения интактного IgG<sub>mix</sub> (**Б**); гель был окрашен Кумасси R250. **В** – типичные кинетические кривые накопления окрашенного продукта (A<sub>450</sub>) окисления ДАБ (0,2 мг/мл) под действием 670 нМ IgG(1) здорового донора и IgG(6) больного шизофренией в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и в отсутствие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Легенда указана на рисунке. Средняя ошибка определения активности не превышала 10 %.

Из всех 75-ти полученных аффинной хроматографией препаратов IgG (см. п. 3.1), включенных в исследование, случайным образом отобраны 18 препаратов IgG больных шизофренией и 14 препаратов здоровых доноров для дальнейшего анализа их свойств. Для доказательства, что полученные препараты IgG обладают пероксидазной и оксидоредуктазной активностью использовали самый строгий и общепринятый критерий – анализ активности после SDS-электрофореза в геле (Рис. 5 **А, Б**). Ранее показано, что если этот критерий выполняется, то выполняются и все остальные известные критерии принадлежности каталитической активности непосредственно антителам [302]. Смесь препаратов IgG больных шизофренией (IgG<sub>mix</sub>) предварительно разделяли с помощью SDS-PAGE. После электрофоретического разделения белков из геля удаляли SDS, а затем гель разрезали на мелкие фрагменты (2–3 мм), которые инкубировали с буфером для экстракции белков. Полученные элюаты использовали для оценки ферментативных активностей. В результате показано, что положение пиков уровней пероксидазной и оксидоредуктазной активностей совпадает с положением интактных IgG<sub>mix</sub> на электрофореграмме (Рис. 5 **А, Б**). Отсутствие других белковых полос и пиков активности

однозначно свидетельствовало о том, что полученные препараты IgG не содержат примесей оксидоредуктаз и их способность катализировать окисление ДАБ является их собственным свойством.

Далее оценены относительные активности всех препаратов IgG в реакциях пероксидазного и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимого окисления ДАБ. На рис. 5 **B** приведены типичные кинетические кривые накопления окрашенного продукта в присутствии препаратов IgG(1) здорового донора и IgG(6) больного шизофренией. Как видно из графика, с увеличением времени инкубации наблюдается увеличение оптической плотности (A<sub>450</sub>), вследствие образования окрашенного продукта окисления ДАБ. В случае антител больных шизофренией обнаружено более выраженное увеличение оптической плотности. При этом в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> регистрируемая активность выше, чем в отсутствие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для количественной оценки относительной активности каждого препарата IgG подбирали концентрацию и время инкубации, соответствующие условиям реакции псевдопервого порядка. Активность определяли на линейных участках зависимостей скорости реакции от концентрации IgG и времени инкубации. Сначала на линейных участках изменения оптической плотности окрашенного продукта (A<sub>450</sub>) в единицу времени определяли начальные скорости реакции для каждого препарата АТ. Затем для оценки относительной активности индивидуальных антител рассчитывали кажущиеся величины  $k_{cat}$  в окислении ДАБ по формуле  $k_{cat} = V \text{ (М/мин)}/[IgG] \text{ (М)}$ . Значения полученных величин представлены в Таблице 5.

Относительные активности проанализированных индивидуальных препаратов IgG сильно варьировали. В случае пероксидазной активности величины  $k_{cat}$  изменялись в диапазоне от 20,1 до 355,8 мин<sup>-1</sup>, а в случае H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимой оксидоредуктазной – в диапазоне от 16,2 до 155,3 мин<sup>-1</sup> (Таблица 5). Согласно критерию Вальда-Вольфовица показано, что медианный уровень пероксидазной активности IgG у больных шизофренией статистически значимо выше в 1,3 раза (p=0,008), а оксидоредуктазной в 1,2 раза выше (p=0,008), чем у здоровых доноров. Эти данные указывают на то, что в случае больных шизофренией наблюдается выраженная тенденция к повышению относительных пероксидазной и оксидоредуктазной активностей абзимов, по сравнению со здоровыми донорами, но этот феномен может быть индивидуальным для каждого пациента. При этом показана выраженная корреляция между изучаемыми активностями у больных шизофренией (r=0,688), но в тоже время у здоровых доноров корреляция оказалась слабой (r=0,323). Анализ высокоактивных препаратов не показал выраженной зависимости от клинических данных. Таким образом, IgG больных шизофренией и здоровых доноров более эффективно окисляют ДАБ в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Таблица 5.** Относительные значения пероксидазной и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-независимой оксидоредуктазной активностей (кажущиеся значения  $k_{cat}$ ) IgG крови больных шизофренией и здоровых доноров.

Номер препарата IgG	Кажущиеся значения $k_{cat}$ <sup>1</sup> , мин <sup>-1</sup>			
	Больные шизофренией		Здоровые доноры	
	Пероксидазная активность <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -независимая оксидоредуктазная активность <sup>2</sup>	Пероксидазная активность <sup>2</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -независимая оксидоредуктазная активность <sup>2</sup>
1	82,6	16,2	55,8	50,4
2	20,1	69,1	71,5	43,0
3	31,3	32,0	72,5	57,0
4	25,6	29,8	53,1	55,2
5	355,8	104,1	95,6	59,7
6	172,6	123,6	62,3	58,2
7	36,0	32,3	67,2	50,8
8	191,5	155,3	54,2	49,0
9	79,2	58,4	69,4	41,8
10	257,1	126,6	70,5	55,4
11	150,4	124,3	51,6	54,7
12	67,2	44,4	92,8	58,0
13	198,5	51,3	60,5	56,6
14	104,6	69,3	65,3	49,4
15	222,0	203,7	-	-
16	87,8	93,1	-	-
17	38,0	60,4	-	-
18	64,4	61,5	-	-
Me [Q1; Q2] <sup>3</sup> , мин <sup>-1</sup>	85,2 [51,2; 177,3]	65,3 [47,8; 109,0]	66,2 [58,2; 70,7]	54,9 [49,9; 56,7]
Коэффициент корреляции Спирмена	0,688 (p=0,002)		0,323 (p=0,26)	

<sup>1</sup> Кажущиеся значения  $k_{cat}$  рассчитаны согласно уравнению  $k_{cat} = V$  (М/мин)/[IgG] (М).

<sup>2</sup> Приведено среднее значение трех независимых экспериментов. Погрешность определения каждого значения  $k_{cat}$  не превышала 10 %.

<sup>3</sup> Медиана, первый и третий квартили.

Механизм и природа обнаруженной окислительно-восстановительной активности абзимов при шизофрении пока остается не до конца ясной. Как известно, ферменты пероксидазы принадлежат к классу оксидоредуктаз, использующих  $H_2O_2$  как акцептор (ЕС 1.11.1) [345]. Некоторые пероксидазы млекопитающих содержат в активном центре ковалентно связанный гем в качестве кофактора. В литературе опубликованы данные о способности моно- и поликлональных антител связывать гем и использовать его как кофактор [346, 347, 348, 349]. При этом показано, что связывание антител с гемом приводит к приобретению ими полиреактивности [347, 348], т.е. способности связываться с различными антигенами, а также к способности катализировать окислительно-восстановительные реакции [346 - 349]. Обнаружена пероксидазоподобная активность комплексов поликлональных IgG с гемом [346]. С использованием индигокармина показано, что окисление этого красителя в присутствии  $H_2O_2$  происходит за счет реакции Фентона с образованием гидроксильных радикалов, которое катализирует комплекс IgG-гем [347]. Можно предположить, что подобный механизм имеет место и в случае обнаруженной пероксидазной активности антител. Однако используемые в данной работе условия получения IgG приводят к диссоциации нековалентных комплексов, поэтому могут существовать другие причины приобретения молекулами IgG пероксидазной активности. Возможно, что подобно металл-зависимым ферментам, пероксидазная активность IgG обусловлена наличием связанных переходных металлов [344]. Высокая металл-связывающая способность IgG объясняется наличием гистидиновых кластеров в различных доменах [350]. Взаимодействие адсорбированных металлов (например,  $Fe^{2+}$ ) с  $H_2O_2$  может приводить к образованию гидроксильного радикала ( $\bullet OH$ ) по реакции Фентона, взаимодействующего с ДАБ. Поэтому нельзя исключить, что IgG катализируют металл-зависимое окисление ДАБ в присутствии  $H_2O_2$ . Важно отметить, что некоторые белки (например, ЧСА, тиреоглобулин и др.) могут обладать пероксидазной активностью, особенно после добавления ионов металлов в реакционную смесь, однако эта активность примерно на 2 порядка ниже, чем активность IgG в тех же условиях [286]. Окисление ДАБ в отсутствие  $H_2O_2$  в реакционной смеси может объясняться обнаруженной способностью антител генерировать  $H_2O_2$  и озон из синглетного кислорода ( $^1O_2\bullet$ ) и воды при облучении УФ и видимым светом [351, 352, 353, 354]. Данный процесс получил название путь окисления воды, катализируемый антителами (antibody catalyzed water oxidation pathway). Возможно, существуют другие механизмы оксидоредуктазной активности IgG.

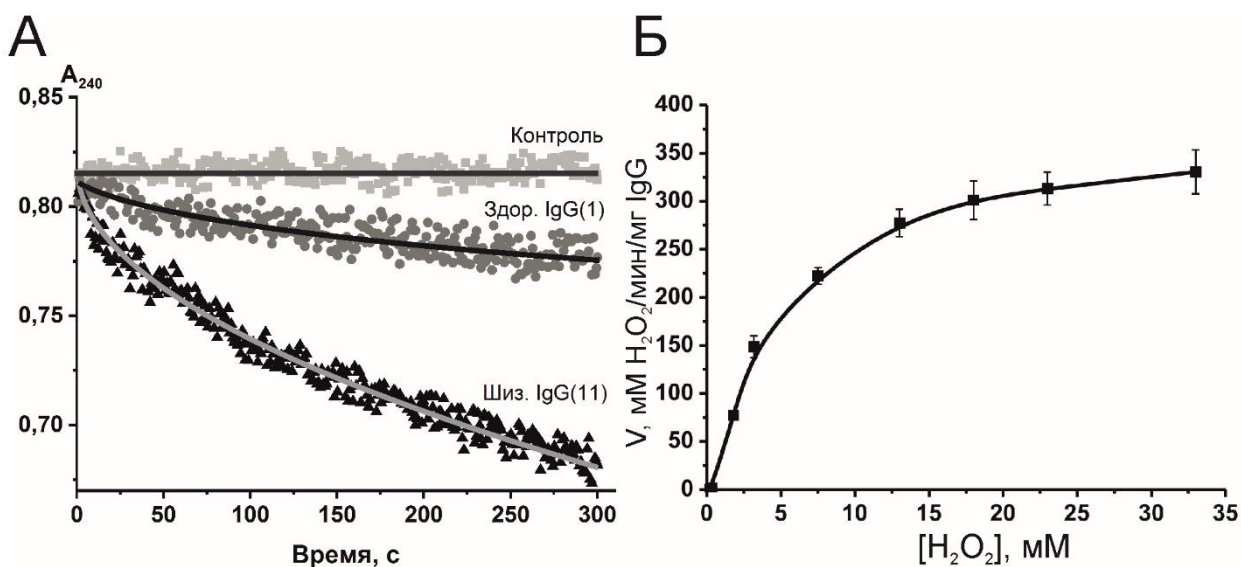
Образование абзимов с окислительно-восстановительной активностью в организме человека может быть связано с иммунизацией различными соединениями, являющимися субстратами для ферментов-оксидоредуктаз, либо их комплексами. Также возможно, что

такие абзимы могут быть антиидиотипическими антителами против различных оксидоредуктаз. Поскольку абзимы с окислительно-восстановительной активностью способны окислять ароматические амины, фенолы, хиноны и другие потенциально токсичные соединения [287], можно предположить, что такие антитела защищают организм от токсических соединений и оксидативного стресса. Учитывая высокое сходство окислительно-восстановительных реакций, катализируемых каноническими пероксидазами и каталазами, нельзя исключить, что IgG с пероксидазной активностью также обладают каталазной активностью.

### 3.3.1.2. Каталазная активность IgG

Каталаза (EC 1.11.1.6) является антиоксидантным ферментом, играющим решающую роль в защите клеток от токсического воздействия высоких концентраций  $H_2O_2$  [355]. Токсическое действие  $H_2O_2$  связано с тем, что из него может образовываться самый реакционно способный активированный кислородный метаболит (АКМ) – гидроксильный радикал. Однако  $H_2O_2$  в низких концентрациях ( $<0,5$  мкМ) рассматривается как вторичный мессенджер [356, 357] и участвует в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки. Показано, что образование  $H_2O_2$  является важным сигнальным событием в ответ на стимуляцию различных рецепторов цитокинами и факторами роста [358]. Важная роль в этом процессе принадлежит NADPH-оксидазам на плазматической мембране, которые активируются в ответ на стимуляцию рецепторов и образуют супероксид, который под действием супероксиддисмутаза превращается в  $H_2O_2$ . Образующийся  $H_2O_2$  проникает в цитоплазму через аквапорины [359] и вызывает инактивацию рецепторподобных тирозинфосфатаз в различных клетках путем окислительной модификации остатков цистеина, тем самым влияя на сигнальную трансдукцию [360]. В нервной системе образующийся  $H_2O_2$  участвует в регуляции многочисленных процессов, начиная от морфогенеза и полярности нейрона, заканчивая синаптической пластичностью и процессом выделения синаптических везикул [358]. Поэтому тонкая регуляция концентрации  $H_2O_2$  как внутри, так и вне клетки очень важна.

При шизофрении показано нарушение окислительно-восстановительного равновесия и преобладание прооксидантного состояния (см. главу 1.1.5). В предыдущей главе выявлено, что IgG пациентов с шизофренией обладают окислительно-восстановительными активностями. В данной главе исследование продолжено и в частности изучена каталазная активность, то есть способность поликлональных IgG катализировать реакцию разложения  $H_2O_2$ .



**Рис. 6.** Каталазная активность препаратов IgG здоровых доноров и больных шизофренией. **А** – типичная зависимость снижения оптической плотности 30 мМ  $H_2O_2$  при  $\lambda = 240$  нм в присутствии 200 нМ препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров. **Б** – типичная зависимость начальной скорости реакции для препарата IgG(11) больного шизофренией от концентрации  $H_2O_2$ .

Из всех 75-ти полученных аффинной хроматографией препаратов IgG (см. п. 3.1), включенных в исследование, в эксперимент случайным образом отобраны 21 препарат IgG здоровых доноров и 26 препаратов больных шизофренией, гомогенность и чистота которых доказана по результатам SDS-PAGE. Для анализа каталазной активности IgG использовали спектрофотометрический метод, при котором регистрируется уменьшение оптической плотности при  $\lambda = 240$  нм, вызванное разложением  $H_2O_2$  [319]. На рис. 6 **А** представлены типичные кинетические кривые изменения поглощения  $H_2O_2$  в присутствии 200 нМ препарата IgG(1) здорового донора и препарата IgG(11) больного шизофренией, а также контрольной смеси, не содержащей АТ. Таким образом, обнаружено, что IgG обладают каталазной активностью и способны разрушать  $H_2O_2$ . При этом установлено, что для всех каталитически активных антител взаимосвязь между начальной скоростью реакции и концентрацией  $H_2O_2$  близка к зависимости Михаэлиса-Ментен, а при концентрации  $H_2O_2$  30 мМ эта зависимость близка к плато (Рис. 6 **Б**). Это свойство каталитических IgG значительно отличает их от канонических каталаз, которые, как известно, не подчиняются обычной кинетике Михаэлиса-Ментен и при высокой концентрации  $H_2O_2$  наблюдается ингибирование фермента вследствие его суицидальной инактивации [319, 361].

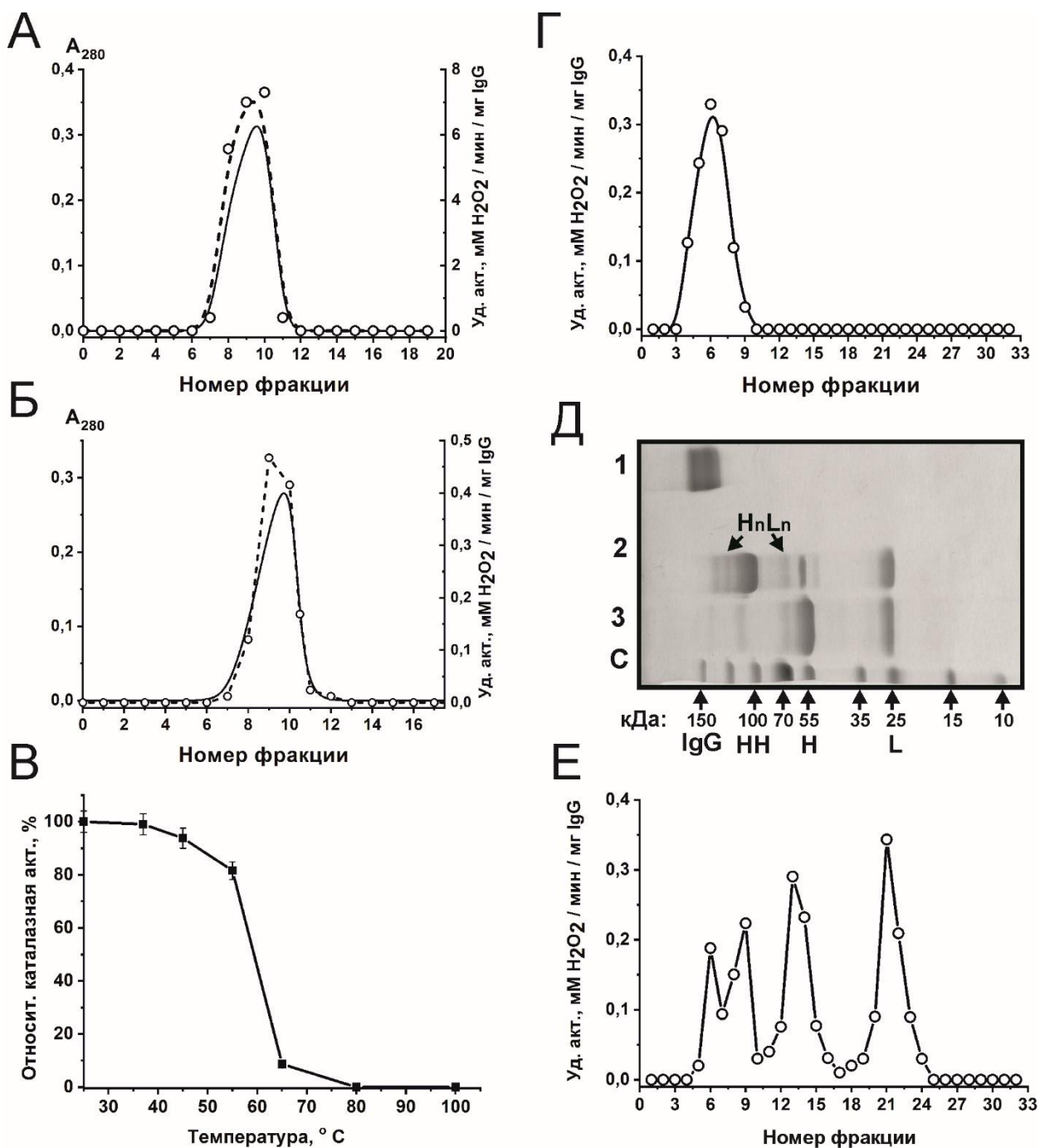
Для доказательства, что обнаруженная каталазная активность является свойством исследуемых IgG, проверены ряд жестких критериев (Рис. 7), разработанных ранее [156]. Помимо показанной прежде гомогенности исследуемых препаратов антител (см.



главу 3.2), вторым критерием является совпадение профилей гель-фильтрации смеси IgG в кислых условиях (при pH = 2,6 происходит диссоциация всех комплексов) с профилем каталитической активности в полученных фракциях (Рис. 7 А, Б), а также отсутствие пиков других белков.

Анализ термической денатурации IgG (Рис. 7 В) является третьим критерием. Как известно, денатурация моноклональных антител начинается примерно при 55°C [362], причем наиболее чувствительным является F<sub>ab</sub>-домен АТ. По результатам проведенного эксперимента после предынкубации смеси препаратов IgG пициентов (IgG<sub>mix</sub>) при 55°C происходит снижение активности на 18%, в то время как при 65°C происходит практически полная потеря активности. Полученные данные подтверждают белковое происхождение активности, а также указывают на сходства со свойствами IgG. Человеческая каталаза является более устойчивым к денатурации ферментом, чем каталазы других млекопитающих [355]. Показано, что температура полумаксимального ингибирования (T<sub>50</sub>) для человеческой каталазы составляет 67,1°C [363], однако в данной работе T<sub>50</sub> для смеси препаратов IgG больных шизофренией оказалась равной 59,5°C. Кроме того, каталаза инактивируется при 70°C [363], а антитела с каталазной активностью – при 65°C. Отличия в термической стабильности между IgG и каталазами являются косвенным доказательством отсутствия примесей фермента в препаратах IgG.

Четвертым критерием является анализ каталазной активности после SDS-PAGE (Рис. 7 Г, Д, Е). Смесь препаратов IgG больных шизофренией (IgG<sub>mix</sub>) разделяли в градиентном 4–18% ПААГ, содержащем SDS, экстрагировали белки из фрагментов геля и анализировали активность в полученных фракциях. Обнаружено, что положение белкового пятна, соответствующего нативным IgG<sub>mix</sub>, на части геля, окрашенной Coomassie R-250 (Рис. 7 Д, дорожка 1), совпадает с пиком каталазной активности в полученных фракциях после экстракции из полосок идентичной половины геля (Рис. 7 Г). Помимо этого, показано, что обработка IgG<sub>mix</sub> восстанавливающим агентом ДТТ и инкубация при 30°C (Рис. 7 Д, дорожка 2) ведет к образованию продуктов неполного восстановления (H<sub>n</sub>L<sub>n</sub> олигомеров), в то время как обработка ДТТ и нагревание до 100°C (Рис. 7 Д, дорожка 3) приводит к практически полному восстановлению дисульфидных связей и образованию H- и L-цепей, но вместе с этим к потере каталитической активности вследствие денатурации (данные не показаны). При этом пики каталитической активности во фракциях, полученных из полосок идентичной половины геля (Рис. 7 Е), совпадают с положением белковых полос, соответствующих фрагментам IgG<sub>mix</sub> (H-, L-цепи и H<sub>n</sub>L<sub>n</sub> олигомеры) на второй половине геля, окрашенной Coomassie R-250 (Рис. 7 Д, дорожка 2).



**Рис. 7.** Доказательства принадлежности каталазной активности непосредственно анализируемым препаратам IgG. **А, Б** – профили гель-фильтрации смесей препаратов IgG больных шизофренией (**А**) и здоровых доноров (**Б**) в кислом буфере Gly-HCl pH 2,6 и каталитической активности в полученных фракциях: (—) – оптическая плотность при  $\lambda = 280$  нм ( $A_{280}$ ); (○) – удельная каталазная активность IgG. **В** – анализ термической стабильности смеси IgG больных шизофренией. За 100% принят исходный уровень активности. **Г, Д, Е** – SDS-ПААГ-анализ каталазной активности смеси интактных IgG (без обработки ДТТ) (**Г**), а также разделенных H-, L-цепей и  $H_nL_n$  олигомеров (после обработки ДТТ) (**Е**). После разделения IgG в градиентном 4–18% ПААГ и экстракции белков из полосок геля проводили анализ каталазной активности в полученных фракциях. Контрольные дорожки геля (**Д**) окрашивали Coomassie R-250: дорожка 1 – интактные IgG, дорожка 2 – IgG, инкубированные с 40 мМ ДТТ в течение 10 мин при 30 °С, дорожка 3 – IgG, инкубированные при 100 °С с ДТТ, дорожка С – стандартные маркеры молекулярной массы.

Таким образом, каталазной активностью обладают не только интактные IgG, но и их Н- и L-цепи. Любые белковые комплексы диссоциируют в присутствии SDS, а электрофоретическая подвижность канонических каталаз не может совпадать с интактными и восстановленными IgG, поскольку молекулярная масса тетрамерной каталазы составляет 225-270 кДа, масса субъединицы каталазы – 55-84 кДа [355], в то время как масса IgG, Н- и L-цепи – 150 кДа, 50 кДа и 25 кДа соответственно. Поэтому обнаружение каталазной активности в областях геля, соответствующих только интактным IgG, либо их фрагментам, является прямым доказательством того, что исследуемые препараты IgG обладают каталазной активностью.

Для количественной оценки каталазной активности IgG проведен скрининг активности 26 препаратов IgG больных шизофренией и 21 препарата IgG здоровых доноров (Таблица 6). Предварительно для каждого препарата были подобраны условия реакции, соответствующие условиям реакции псевдо-первого порядка в линейных областях зависимости скорости реакции от концентрации IgG. По результатам скрининга показано, что медианные значения удельной каталазной активности IgG пациентов с шизофренией статистически значимо ( $p < 0,05$ ) в 3,8 раз выше активности IgG здоровых доноров. Необходимо отметить, что удельная каталазная активность IgG пациентов варьировала в диапазоне 0,1–14,0 удельных единиц (УЕ –  $\text{мМ Н}_2\text{О}_2/\text{мин}/\text{мг IgG}$ ). Кажущиеся значения  $k_{\text{cat}}$  при фиксированной концентрации  $\text{Н}_2\text{О}_2$  (30 мМ) для IgG больных также широко варьировали ( $0,14\text{--}21,0 \times 10^3 \text{ мин}^{-1}$ ). Удельная активность IgG здоровых доноров (0,11–0,98 УЕ) и кажущиеся значения  $k_{\text{cat}}$  ( $0,17\text{--}1,46 \times 10^3 \text{ мин}^{-1}$ ) также варьировали, но в меньших пределах. Таким образом, IgG пациентов с шизофренией обладали бóльшим уровнем каталазной активности и эффективнее разлагали  $\text{Н}_2\text{О}_2$ , чем IgG здоровых доноров. Однако выраженной зависимости активности от клинических особенностей заболевания не обнаружено. Но при этом, два человека, из сыворотки которых получены препараты IgG(9) и IgG(23), обладающие наибольшим уровнем каталазной активности, имели самое тяжелое течение: (IgG(9) – параноидная шизофрения, ведущая негативная симптоматика, длительность заболевания 15 лет; IgG(23) – простая шизофрения, ведущая негативная симптоматика, длительность заболевания 3 года). Сравнить уровень каталазной и пероксидазной активностей IgG не представлялось возможным, поскольку активности определялись на разных группах пациентов.

В целом полученные данные указывают на то, что IgG здоровых доноров и больных шизофренией обладают значительно меньшим (более чем на три порядка) уровнем удельной каталазной активности, чем классические каталазы [319, 320]. Сравнить удельные активности IgG и канонических каталаз сложно, вследствие некоторых различий

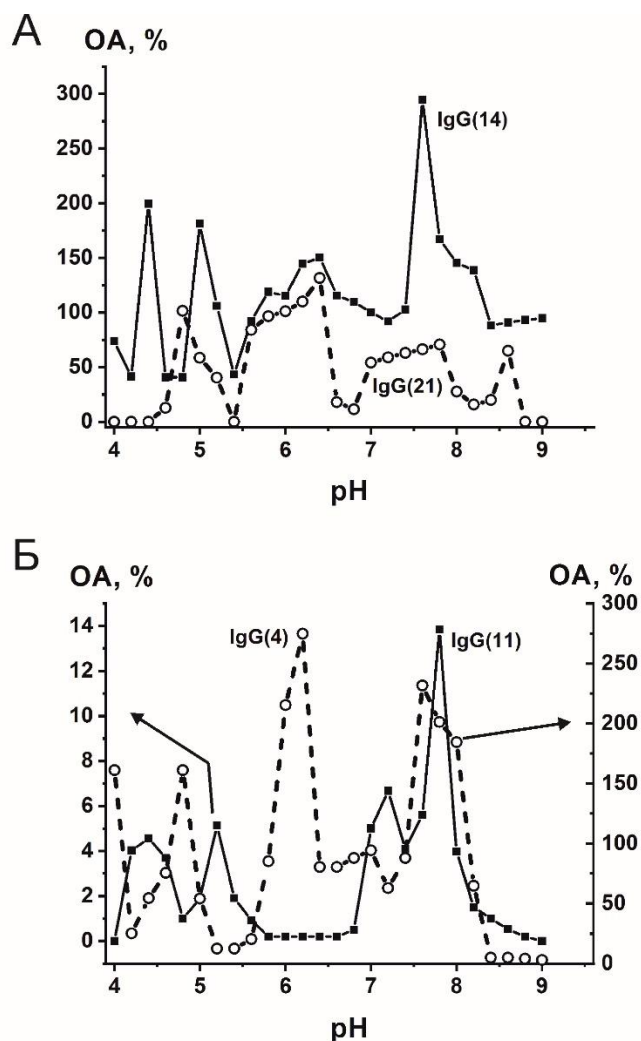
в методике постановки эксперимента, концентрации субстрата и фермента. Кроме того, поскольку в эксперименте используются поликлональные АТ, удельная каталазная активность отдельных субфракций IgG может быть значительно выше других. Однако используемые методы не позволяют идентифицировать эти субфракции, а также определить, какой процент антител обладает активностью.

**Таблица 6.** Удельная активность (УА) и кажущиеся значения  $k_{cat}$ , характеризующие разложение  $H_2O_2$  препаратами IgG из сыворотки больных шизофренией и здоровых доноров.

Номер препарата IgG	Больные шизофренией		Здоровые доноры	
	УА, мМ $H_2O_2$ /мин/мг IgG*	Каж. $k_{cat} \times 10^{-3}$ , $min^{-1}^{**}$	УА, мМ $H_2O_2$ /мин/мг IgG*	Каж. $k_{cat} \times 10^{-3}$ , $min^{-1}^{**}$
1	1,16	1,74	0,16	0,24
2	0,13	0,19	0,23	0,34
3	0,19	0,29	0,17	0,26
4	2,59	3,88	0,98	1,46
5	0,51	0,76	0,30	0,44
6	0,52	0,77	0,39	0,58
7	0,41	0,62	0,32	0,49
8	1,00	1,49	0,24	0,35
9	13,99	20,99	0,11	0,17
10	5,31	7,97	0,32	0,48
11	2,75	4,12	0,21	0,32
12	0,45	0,68	0,31	0,46
13	0,71	1,06	0,82	1,24
14	1,03	1,54	0,64	0,96
15	0,61	0,91	0,24	0,36
16	0,17	0,25	0,24	0,36
17	0,10	0,14	0,71	1,07
18	0,32	0,47	0,42	0,63
19	0,32	0,48	0,22	0,33
20	4,10	6,15	0,11	0,17
21	2,20	3,30	-	-
22	6,70	10,05	-	-
23	13,70	20,55	-	-
24	7,10	10,65	-	-
25	3,80	5,70	-	-
26	3,80	5,70	-	-
М±SD и Ме [Q1; Q3]	2,83±3,84 1,01 [0,42; 3,8]	4,25±5,76 1,52 [0,63; 5,7]	0,36±0,24 0,27 [0,11; 0,39]	0,53±0,36 0,4 [0,17; 0,59]

\* Среднее значение трех независимых экспериментов. Погрешность определения каждого значения активности не превышала 7-15 %.

\*\* Кажущиеся значения  $k_{cat}$  рассчитаны согласно уравнению  $k_{cat} = V (M/мин)/[IgG] (M)$ .



**Рис. 8.** Зависимость относительной каталазной активности четырех различных препаратов IgG больных шизофренией от величины pH реакционной среды. *А* – зависимость для препаратов IgG(14) и IgG(21). *Б* – зависимость для препаратов IgG(4) и IgG(11). Относительная активность (ОА, %) IgG(14) при pH 7,0 принята за 100%. Погрешность определения начальной скорости реакции в трех независимых экспериментах не превышала 7–10%.

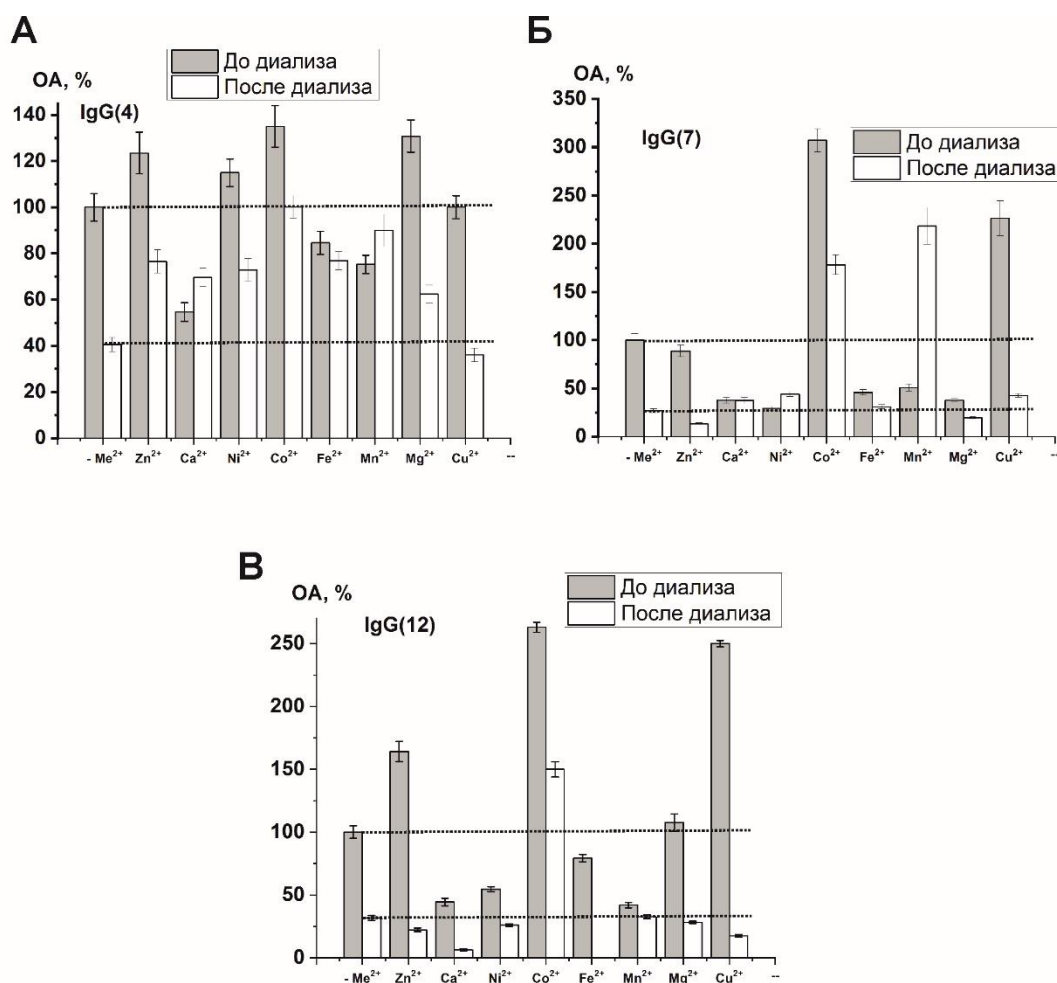
Далее представлены данные детального исследования биохимических свойств антител с каталазной активностью. Проведен анализ зависимости каталазной активности IgG четырех больных параноидной шизофренией от величины pH реакционной среды (Рис. 8). Как известно, все канонические ферменты человека (включая оксидоредуктазы) имеют один ярко выраженный pH-оптимум [94]. В частности, каталаза человека обладает жесткой и стабильной тетрамерной структурой, поэтому является устойчивой к изменению значений pH [355] и имеет широкий оптимум pH (6,8-7,5), но наиболее активна при pH 7,0 [319]. Проведенный анализ оптимального значения pH для четырех недиализированных IgG больных шизофренией показал, что все препараты IgG демонстрировали несколько хорошо выраженных оптимумов pH, отличных от таковых для классического фермента (Рис. 8). Все IgG обладали повышенной каталазой

активностью при рН 5,5–6,5 и 7,5–8,5. IgG(14) и IgG(11) демонстрируют два оптимума при рН от 4,0 до 5,5, тогда как IgG(4) и IgG(21) демонстрируют в этой области рН только один оптимум при рН приблизительно 4,5–4,7 (Рис. 8 *А, Б*). В отличие от человеческой каталазы, оптимальные значения рН четырех IgG больных не равны 7,0 (Рис. 8). Максимальная активность IgG при разных значениях рН в 2,4–3 раза выше, чем при рН 7,0. Наличие нескольких оптимумов рН объясняется тем, что, в отличие от канонических ферментов, пул поликлональных антител может содержать множество субфракций моноклональных абзимов с различным оптимумом рН. Подобные данные получены для IgG с пероксидазной активностью, для которых также показано несколько выраженных оптимумов в диапазоне рН от 5 до 9 [364]. Таким образом, оптимальные значения рН для антител с каталазной активностью значительно отличаются от значений канонического фермента, что является еще одним доказательством в пользу отсутствия примесей каталаз в препаратах АТ.

Известно, что каталаза млекопитающих является гем-Fe<sup>2+</sup>-зависимым ферментом [355]. Кроме того, различные металлы с переменной степенью окисления могут также участвовать в реакциях, катализируемых IgG. Поэтому в данной работе проведен анализ влияния на каталазную активность IgG диализа против хелатирующего ионы металлов агента (ЭДТА), а также анализ зависимости активности от добавления ионов металлов (Рис. 9). Для анализа использованы препараты IgG больных шизофренией со средней и низкой активностью, которые отличались между собой по подтипу параноидной шизофрении (IgG(4) – F20.00, IgG(7) – F20.01, IgG(12) – F20.01). Диализ трех препаратов IgG больных шизофренией против буфера, содержащего 0,3 М ЭДТА, и добавление 0,1 М ЭДТА в реакционную смесь приводили к снижению в 2,5–3,7 раза (среднее значение в 3,1±0,4 раза) каталазной активности IgG (Рис. 9). Однако IgG больных шизофренией не теряли активность полностью, в то время как по литературным данным диализ крысиных IgG с пероксидазной и оксидоредуктазной активностью против ЭДТА приводил к полной потере активности [343, 344]. Но в тоже время человеческие IgG с пероксидазной активностью также не полностью теряли активность после диализа [286]. Из этих данных можно сделать вывод, что в отличие от крысиных IgG, полностью зависящих от ионов металлов, человеческие IgG обладают металл-зависимой и металл-независимой каталазной активностью.

Как известно, некоторые ионы металлов с переменной валентностью могут стимулировать спонтанную деградацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [365], поэтому все контрольные смеси в экспериментах по влиянию ионов металлов на каталазную активность содержали соответствующие ионы металлов, а наличие спонтанной деградации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> учитывалось

при расчетах. Относительную каталазную активность (ОА) IgG рассчитывали по разности наклонов кривых, соответствующих спонтанному диспропорционированию  $H_2O_2$  в присутствии только ионов металлов и разложению  $H_2O_2$  в присутствии IgG и ионов металлов в той же концентрации.



**Рис. 9.** Влияние диализа, а также ионов различных металлов на относительную каталазную активность трех индивидуальных препаратов IgG больных шизофренией: IgG(4) – **A**; IgG(7) – **Б**; IgG(12) – **В**. Относительную каталазную активность (ОА, %) для каждого недиализованного препарата IgG принимали за 100%. Используемые ионы металлов указаны на рисунке.

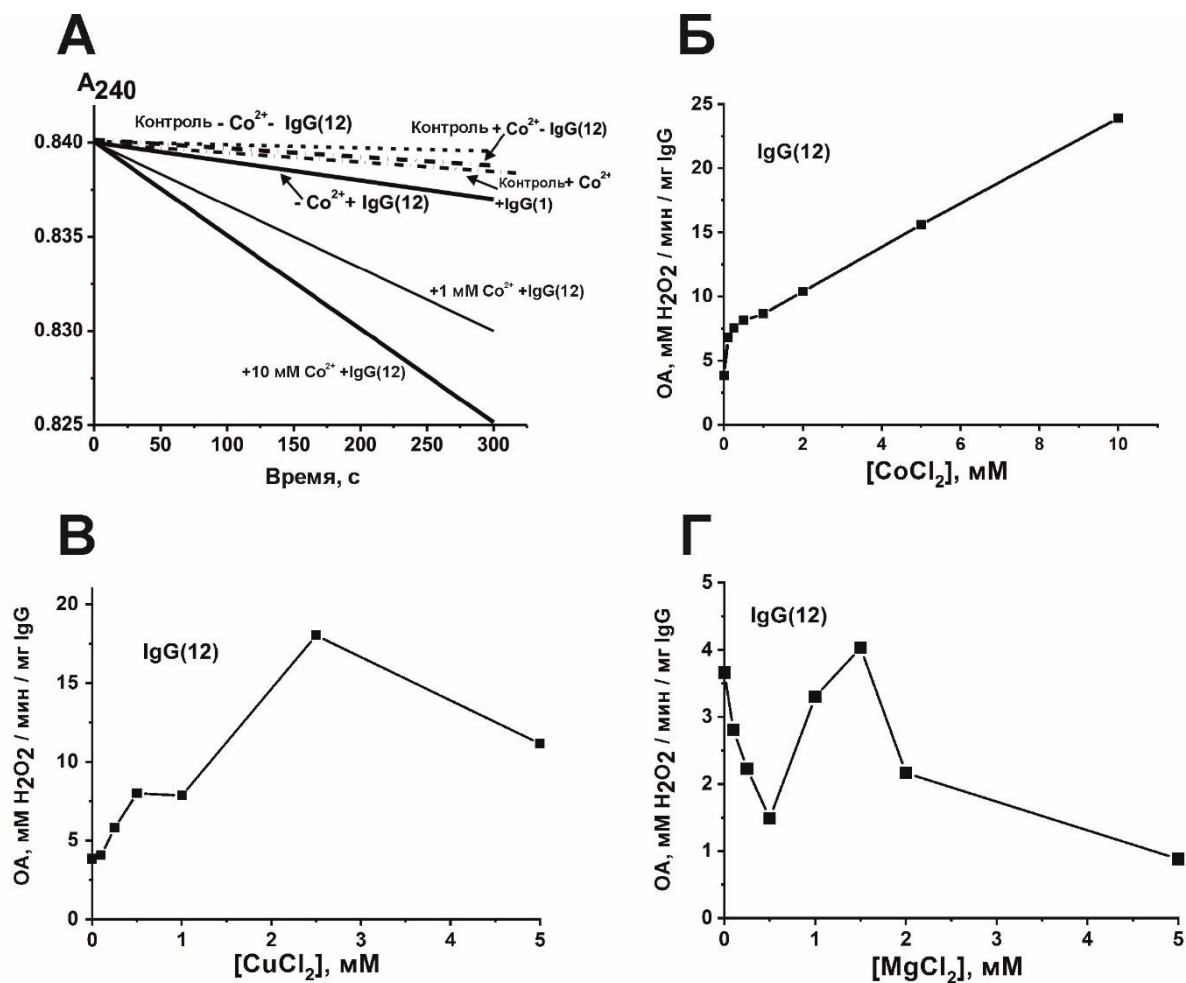
В результате проведенных экспериментов показано, что добавление ионов металлов в концентрации 1,5 мМ к диализованным и недиализованным антителам приводило к различным эффектам в зависимости от препарата IgG больных шизофренией (Рис. 9). Увеличение ОА недиализованных IgG в присутствии ионов металлов изменялось в следующем ряду: для IgG(4):  $Co^{2+} \geq Mg^{2+} \geq Zn^{2+} \geq Ni^{2+}$  (Рис. 9 **A**); для IgG(7):  $Co^{2+} > Cu^{2+}$  (Рис. 9 **Б**); для IgG(12):  $Co^{2+} \geq Cu^{2+} > Zn^{2+}$  (Рис. 9 **В**). После диализа IgG(4) увеличение активности в присутствии металлов происходило в следующем ряду:  $Co^{2+} \geq Mn^{2+} \geq Fe^{2+} \geq Zn^{2+} \geq Ni^{2+} \geq Ca^{2+} \geq Mg^{2+}$  (Рис. 9 **A**). Все ионы металлов, за исключением  $Mn^{2+}$  и  $Co^{2+}$ , ингибировали или не оказывали существенного влияния на каталазную активность

диализированного IgG(7) (Рис. 9 Б). Диализированный IgG(12) увеличивал свою активность только в присутствии  $\text{Co}^{2+}$  (Рис. 9 В). Интересно, что в отличие от канонических каталаз, ионы  $\text{Fe}^{2+}$  не активировали каталазную активность диализированных IgG(12) и IgG(7) (Рис. 9 В и 9 Б), однако активность IgG(4) увеличивалась в 1,8 раз в присутствии этого металла (Рис. 9 А). Ионы  $\text{Cu}^{2+}$  практически не оказывали влияния на каталазную активность всех трех диализированных IgG (Рис. 9). Ионы  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  с постоянной валентностью, которые не могут являться кофакторами классических каталаз, не активировали ОА препаратов IgG(7) и IgG(12) (Рис. 9 В и 9 Б), но в то же время заметно увеличивали ОА препарата IgG(4) (Рис. 9 А). Увеличение ОА может объясняться тем, что связывание таких ионов стабилизирует конформацию молекулы IgG, тем самым увеличивая каталитическую активность. Считается, что подобным образом ионы  $\text{Zn}^{2+}$  не принимают непосредственного участия в катализе, но стабилизируют структуру активного центра антиоксидантного фермента Cu, Zn-супероксиддисмутаза (ЕС 1.15.1.1) [366, 367]. Другим примером является алкогольдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.1), в которой каждая из двух субъединиц содержит два атома Zn, но только один из них вовлечен в катализ, а другой стабилизирует молекулу [368]. В целом, среди ионов металлов с переменной валентностью лучшим активатором для всех трех IgG больных шизофренией является  $\text{Co}^{2+}$ . Кобальт относительно редко встречается среди кофакторов ферментов, у человека он присутствует в основном в составе корринового гетероцикла витамина  $\text{B}_{12}$  в двух ферментах (метилмалонил-СоА мутаза и метионин синтетаза) [369] и в качестве активатора для каталитических антител идентифицирован впервые. Таким образом, каждый из трех препаратов IgG демонстрирует специфические зависимости от различных ионов металлов до и после диализа. Полученные данные указывают на то, что у каждого пациента с шизофренией образуется собственный репертуар абзимов с каталазной активностью.

Помимо этого проанализировано влияние на каталазную активность IgG некоторых ионов металлов в зависимости от их концентрации. Как видно из рис. 10 А, происходила слабая самопроизвольная деградация  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии 10 мМ  $\text{Co}^{2+}$ , и в отсутствие IgG (кривая «Контроль + $\text{Co}^{2+}$  -IgG(12), наличие которой учитывалось во всех расчетах. Однако, каталазная активность в присутствии IgG(12) без добавления  $\text{Co}^{2+}$  оказалась значительно выше спонтанной активности. Добавление  $\text{Co}^{2+}$  в концентрациях 1 и 10 мМ увеличивало активность препарата IgG(12) примерно в 3,3 и 5,3 раза соответственно (Рис. 10 А). В то же время, добавление 10 мМ  $\text{Co}^{2+}$  в реакционную смесь с препаратом IgG(1) здорового донора, не обладающего активностью, не приводило к увеличению активности (кривая «Контроль + $\text{Co}^{2+}$  +IgG(1)»). Зависимость ОА препарата IgG(12) от



концентрации  $\text{Co}^{2+}$  (Рис. 10 Б) гиперболически возрастала при концентрации  $\text{Co}^{2+} < 1,5$  мМ, при более высоких концентрациях – возрастала линейно.



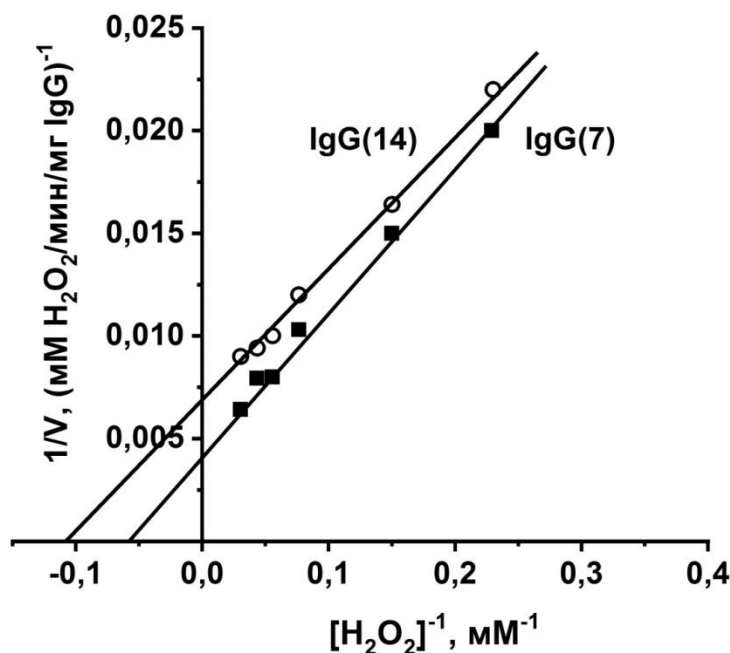
**Рис. 10.** Зависимость каталазной активности препаратов IgG больных шизофренией от присутствия ионов металлов в различной концентрации. **А** – временные зависимости снижения оптической плотности при 240 нм ( $A_{240}$ ), вызванного разложением  $\text{H}_2\text{O}_2$  в отсутствие и в присутствии 0,3 мкМ IgG(12), IgG(1) и  $\text{CoCl}_2$  в различных концентрациях. Контрольные кривые («Контроль -  $\text{Co}^{2+}$  - IgG(12)» и «Контроль +  $\text{Co}^{2+}$  - IgG(12)») соответствуют реакционным смесям, не содержащим IgG(12), инкубированным в отсутствие или в присутствии 10 мМ  $\text{CoCl}_2$ . Контрольная кривая «Контроль +  $\text{Co}^{2+}$  + IgG(1)» соответствует реакционной смеси, содержащей 10 мМ  $\text{Co}^{2+}$  и препарат IgG(1) здорового донора, не обладающего каталазной активностью. **Б, В, Г** – зависимости уровня относительной каталазной активности (OA) препарата IgG(12) от концентрации ионов  $\text{Co}^{2+}$  (**Б**),  $\text{Cu}^{2+}$  (**В**) и  $\text{Mg}^{2+}$  (**Г**).

Зависимости OA препарата IgG(12) от присутствия  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (Рис. 10 **В, Г**) показали более сложный характер. При увеличении концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  OA препарата IgG(12) сначала возрастала, затем при концентрации  $\text{Cu}^{2+} > 2,5$  мМ – снижалась (Рис. 10 **В**). В случае  $\text{Mg}^{2+}$  при увеличении концентрации до 0,5 мМ сначала наблюдалось ингибирование OA, затем в интервале от 0,5 до 1,5 мМ происходило увеличение OA, а при более высоких концентрациях – снижение OA (Рис. 10 **Г**). Важно отметить, что различные концентрации ионов  $\text{Mg}^{2+}$  оказывали значительно меньший эффект на OA препарата

IgG(12) больного шизофренией, по сравнению с  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ . Полученные данные подтверждают гетерогенность и индивидуальный репертуар IgG у каждого пациента, а также указывают на различное сродство IgG к ионам металлов. Согласно литературным данным, IgG имеют высокое сродство к  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$ , поскольку при хроматографии на сорбентах с иммобилизованными ионами металлов происходит связывание и разделение IgG на субфракции [350, 370]. Взаимодействие IgG с ионами металлов объясняется образованием координационных связей между иммобилизованными ионами металлов с имидазольной группой гистидина, тиоловой группой цистеина, индолилальной группой триптофана и концевой аминогруппой [371]. Наличие гистидиновых (His-X-His и His-X-X-His) или цистеиновых (Cys-X-X-Cys) кластеров в молекуле также способствует связыванию металлов [350, 371]. Во взаимодействии с тяжелыми металлами ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) важную роль играют карбоксильные и фосфатные функциональные группы [371]. Наличие адсорбированных ионов металлов с IgG показано методом двухструйной плазменной атомно-эмиссионной спектроскопии [372, 373]. Обнаружено, что лиофилизированные IgG больных рассеянным склерозом и системной красной волчанкой содержат ряд хелатированных металлов, относительное содержание которых уменьшалось в ряду:  $\text{Ca} \geq \text{Zn} \geq \text{Ti} \geq \text{Mg} \geq \text{Al} \geq \text{Fe} \geq \text{Cu} \geq \text{Ni} > \text{Mn}$  [373]. Фракции, полученные элюцией металлов с иммобилизованных IgG на Protein G-Sepharose буфером с ЭДТА, содержали различные композиции металлов, относительная концентрация которых уменьшалась в ряду:  $\text{Fe} \geq \text{Ca} > \text{Cu} \geq \text{Zn} \geq \text{Mg} \geq \text{Mn} \geq \text{Pb} \geq \text{Co} \geq \text{Ni}$  [372]. Таким образом, IgG могут адсорбировать различные металлы на своей поверхности, что может объяснять окислительно-восстановительные свойства поликлональных IgG.

Каталаза является одним из самых эффективных ферментов и способна разлагать миллионы молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  в секунду. В данной работе определены кинетические параметры каталазной реакции, катализируемой препаратами больных IgG(7) и IgG(14) (Рис. 11). Зависимости начальной скорости реакции от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  подчинялись зависимости Михаэлиса-Ментен. В случае препарата IgG(7) значения  $K_m$  и  $k_{\text{cat}}$  составили:  $K_m = 19,2 \pm 1,5$  мМ,  $k_{\text{cat}} = (3,4 \pm 0,3) \times 10^5$  мин<sup>-1</sup>. Препарат IgG(14) продемонстрировал более высокое сродство к  $\text{H}_2\text{O}_2$ , но меньшую скорость реакции:  $K_m = 9,4 \pm 0,7$  мМ и  $k_{\text{cat}} = (1,9 \pm 0,16) \times 10^5$  мин<sup>-1</sup>. По литературным данным значения  $k_{\text{cat}}$  для каталазы эритроцитов и печени быка составляют  $2,22$  и  $2,27 \times 10^7$  с<sup>-1</sup> соответственно [374]. Каталаза эритроцитов человека имеет сопоставимые значения  $k_{\text{cat}} = 0,59 \times 10^6$  с<sup>-1</sup> [375]. Полученные в данной работе значения  $k_{\text{cat}}$  для IgG больных шизофренией ( $1,9-3,4 \times 10^5$  мин<sup>-1</sup> =  $3,2-5,7 \times 10^3$  с<sup>-1</sup>) оказались примерно на три-четыре порядка ниже, чем для классического фермента. Известно, что  $K_m$  для фермента из эритроцитов и печени быка составляет  $1,39$  и  $1,29$  М

$\text{H}_2\text{O}_2$  соответственно [374]. Полученные значения  $K_m$  для препаратов IgG на три порядка ниже, чем для фермента, что указывает на более высокое сродство IgG с каталазной активностью к субстрату по сравнению с нативной каталазой. Полученные результаты согласуются с имеющимися данными о кинетических параметрах абзимов, согласно которым значения  $k_{\text{cat}}$  для известных каталитических IgG примерно в  $10^2$ – $10^6$  раз ниже по сравнению с соответствующими классическими ферментами с такой же каталитической активностью [155].



**Рис. 11.** Кинетические графики зависимости относительных начальных скоростей каталазной реакции от концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  в координатах Лайнуивера-Берка для препаратов IgG(7) (0,74  $\mu\text{M}$ ) и IgG(14) (0,72  $\mu\text{M}$ ). Погрешность определения начальной скорости из трех экспериментов в каждом случае не превышала 7–10%.

Природа обнаруженной каталазной активности поликлональных IgG человека может объясняться несколькими механизмами. Во-первых, как было указано ранее, благодаря наличию адсорбированных на поверхности ионов металлов IgG могут приобретать окислительно-восстановительные свойства. Известно, что классические методы выделения IgG не приводят к полной потере адсорбированных ионов металлов [372]. Различные комплексы переходных металлов могут выступать в качестве доноров электронов, тем самым способствуя разложению  $\text{H}_2\text{O}_2$  за счет реакции Фентона (при этом, в случае  $\text{Fe}^{2+}$  образуется  $\text{Fe}^{3+}$ ), а при наличии восстановителя в системе (например,  $\bullet\text{O}_2$ ) каталитический цикл может замыкаться ( $\text{Fe}^{3+}$  восстанавливается до  $\text{Fe}^{2+}$  по реакции Габера-Вейса) [376]. Также нельзя исключить, что комплексообразование ионов металлов с некоторыми аминокислотными остатками на поверхности IgG может привести к

образованию «специфических сайтов», структурно схожих с активными центрами ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции [286]. Кроме того, как указано ранее (см. главу 3.3.1.1), IgG могут связываться с гемом, и использовать его как кофактор для катализа окислительно-восстановительных реакций [346, 347]. Во-вторых, каталазная активность IgG может объясняться наличием множества редокс-активных остатков цистеина в составе молекулы [377]. Под действием  $H_2O_2$  восстановленные остатки цистеина могут окисляться с образованием сульфеновой кислоты [378]. Поскольку в организме присутствуют окислительно-восстановительные регуляторы, такие как глутатион и белки тиоредоксины, которые восстанавливают сульфеновую кислоту до цистеина, заманчиво предположить, что каталитические IgG и тиоредоксин образуют замкнутую систему, участвующую в удалении АКМ. Как известно, у млекопитающих кроме металл-зависимых, присутствуют ферменты, содержащие тиольную или селенольную группу в активном центре, способные восстанавливать  $H_2O_2$ . Глутатион-зависимые пероксидазы (ЕС 1.11.1.9) содержат остатки селеноцистеина в активном центре [345]. С помощью метода рентгеновского флуоресцентного анализа с синхротронной эмиссией показано, что молекулы IgG содержат селен [286]. Также в организме представлено семейство белков пероксиредоксинов (ЕС 1.11.1.15), участвующих в удалении  $H_2O_2$  и имеющих в активном центре остатки цистеина [379]. Нельзя исключить, что другие белки также способны проявлять каталазную активность, однако, по нашим данным активность, например, ЧСА оказалась в 2 раза ниже, чем активность IgG пациентов с шизофренией (данные не опубликованы). Таким образом, наряду с каталазами, глутатион-пероксидазами и пероксиредоксинами, IgG с каталазной активностью также могут участвовать в регуляции концентрации  $H_2O_2$ .

Появление каталитических антител с каталазной активностью среди всего пула IgG организма может являться компенсаторной реакцией на недостаточность работы антиоксидантных систем и преобладание прооксидантных процессов у больных шизофренией. Продукты свободно-радикального окисления могут выступать в качестве гаптенов, имитировать структуры промежуточных соединений окислительно-восстановительных реакций и стимулировать, таким образом, антиген-зависимое образование IgG. Все перечисленные процессы могут приводить к образованию пула IgG, имеющих схожую структуру  $F_{ab}$ -домена со структурой активных центров антиоксидантных ферментов. Учитывая низкую каталитическую активность IgG по сравнению с классическими антиоксидантными ферментами, вклад IgG в общую антиоксидантную активность может быть не таким значимым. Тем не менее, благодаря высокому содержанию в крови и длительной циркуляции IgG с окислительно-

восстановительными активностями могут участвовать в регуляции оксидативных нарушений в кровотоке. Кроме того, учитывая способность антител накапливаться в очагах воспаления, каталитические IgG наряду с каталазами [380] могут участвовать в ограничении повреждений, вызванных высокой концентрацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и оксидативными процессами в этих зонах. На это указывает наличие нескольких рН-оптимумов для каталазной активности IgG при рН<7 (а в зоне воспаления, как известно, низкое значение рН), а также выраженная активность при высокой концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 мМ). Таким образом, IgG с окислительно-восстановительными активностями могут участвовать в работе антиоксидантной системы, однако вклад IgG в данный процесс еще предстоит выяснить.

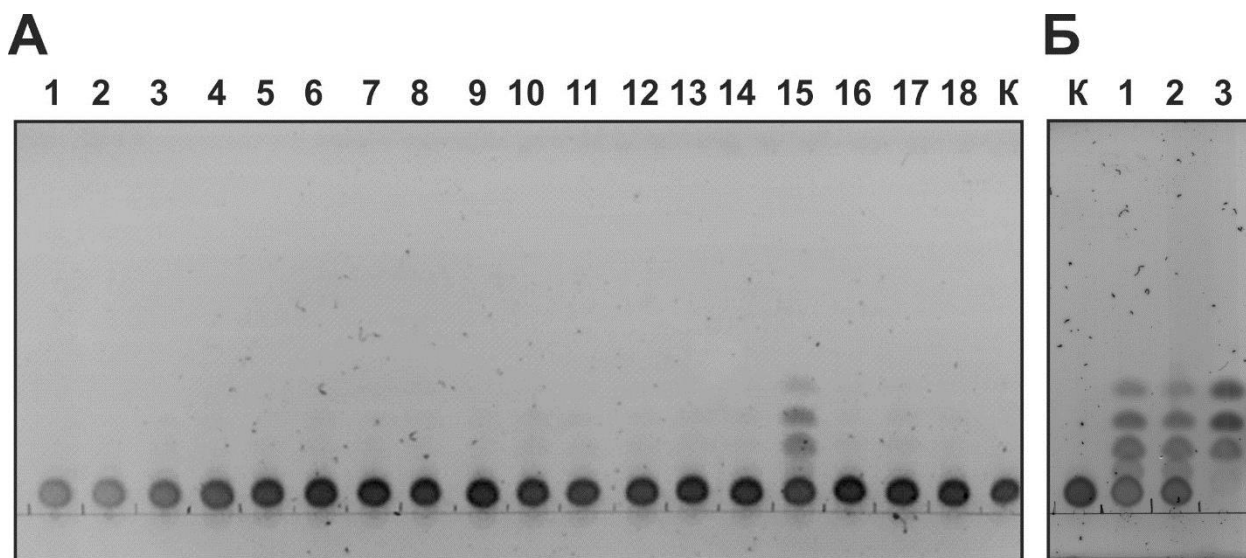
### 3.3.2. Исследование гидролитических активностей IgG при шизофрении

Известно, что различные патологические и физиологические состояния сопровождаются образованием абзимов с гидролитическими активностями (см. главу 1.1.6), поэтому в дальнейшей работе исследована способность IgG больных шизофренией катализировать гидролитические реакции, в частности, гидролиз олигосахарида, АТР, ДНК, различных РНК и микроРНК, гистонов и других белков.

#### 3.3.2.1. Олигосахарид-гидролизующая активность антител

Как подробно описано в главе 1.1.6, в крови больных СКВ [227], РС [236], а также в молоке здоровых женщин [272] обнаружены IgG и sIgA с высокой олигосахарид-гидролизующей (амилолитической) активностью. Кроме того известно, что кровь мышей MRL/MpJ-lpr, склонных к спонтанному развитию СКВ, также содержит IgG с амилолитической активностью [381]. Исходя из этих данных, можно предполагать, что кровь больных шизофренией также содержит IgG, гидролизующие олигосахариды. Однако нами получен неожиданный результат. В то время как контрольные IgG аутоиммунных мышей (Рис. 12 **Б**, дорожки 1 и 2), а также sIgA молока (Рис. 12 **Б**, дорожка 3) эффективно гидролизировали олигосахарид, из 18 препаратов IgG больных шизофренией только один препарат IgG гидролизовал мальтогептозид (Рис. 12 **А**, дорожка 15). При этом активность IgG аутоиммунных мышей и sIgA молока достоверно детектировалась уже после 12 ч инкубации, в то время как инкубация препаратов IgG больных шизофренией с мальтогептозидом даже в течении 24 ч не позволяла обнаружить активность. Таким

образом, только один из IgG пациентов с шизофренией обладал способностью гидролизовать  $\alpha$ -(1→4)-гликозидные связи в мальтоолигосахариде. Отсутствие амилолитической активности практически у всех препаратов IgG больных шизофренией является важной индивидуальной особенностью этого заболевания. Полученные данные также указывают на различия в механизмах образования каталитических антител при шизофрении по сравнению с аутоиммунными заболеваниями.

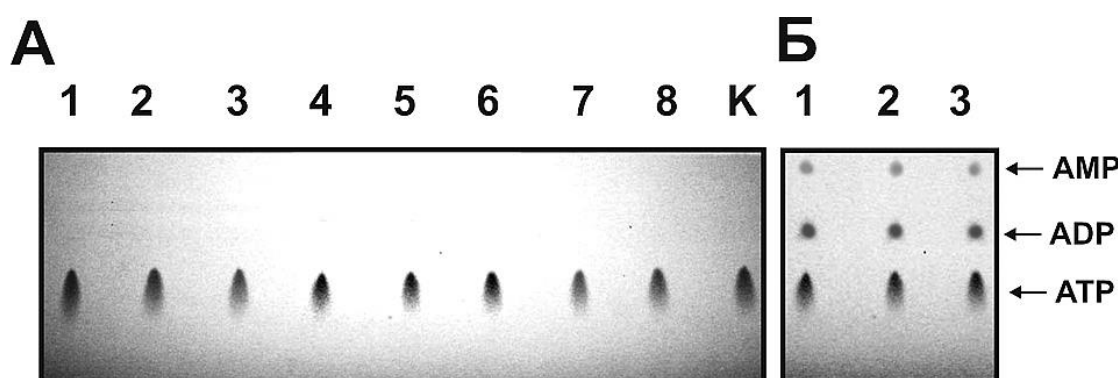


**Рис. 12.** Анализ олигосахарид-гидролизующей (амилолитической) активности IgG методом ТСХ. **А** – анализ амилазной активности больных шизофренией; дорожки 1-18 соответствуют 24 ч инкубации 1, мМ олигосахарида в присутствии 0,1 мг/мл IgG от 18 различных больных шизофренией. **Б** – положительные контроли гидролиза олигосахарида в присутствии 0,1 мг/мл IgG из крови двух аутоиммунных мышей (дорожки 1 и 2) и 0,05 мг/мл sIgA молока здоровых женщин (дорожка 3) в течение 12 ч. Дорожки К – инкубация олигосахарида в отсутствие IgG (**А**, **Б**).

### 3.3.2.2. АТФ-гидролизующая активность антител

АТФ и другие пуриновые метаболиты (ADP, AMP, аденозин) являются молекулярными фрагментами, связанными с повреждением клетки (damage-associated molecular patterns, DAMPs) [382, 383]. Различные DAMPs, в том числе и АТФ, выделяются клетками при разнообразных повреждениях клетки, приводящим к апоптозу, нетозу, пироптозу, ферроптозу, некрозу и другим процессам, тем самым стимулируя не инфекционное «стерильное» воспаление [384, 385]. По современным представлениям, АТФ способствует развитию воспаления, в то время как аденозин является иммунодепрессантом и снижает воспаление [382]. При этом выделившийся АТФ действует через P2X и P2Y рецепторы, либо дефосфорилируется растворимыми или плазматическими эктонуклеотидазами, высвобождая аденозин, который взаимодействует с аденозиновыми P1 рецепторами [382, 385]. Поэтому гидролиз внеклеточной АТФ

посредством различных АТРаз способствует снижению воспаления [386]. Помимо различных АТРаз способностью гидролизовать АТР обладают каталитические антитела из крови аутоиммунных мышей [324], а также молока человека [273]. Такие абзимы наряду с АТРазами могут участвовать в регуляции воспаления в различных тканях. Однако в данной работе обнаружено, что ни один из 18 препаратов IgG больных шизофренией не расщеплял АТР даже в течение 24 ч при очень высокой концентрации IgG (0,4 мг/мл) (Рис. 13 А, дорожки 1–8). В то же время IgG аутоиммунных мышей и sIgA молока человека даже при более низкой концентрации (0,05 мг/мл) приводили к образованию различных дефосфорилированных форм АТР (ADP и AMP) (Рис. 13 Б, дорожки 1–3). Отсутствие АТРазной активности IgG указывает на различия в механизмах образования абзимов при шизофрении и аутоиммунных заболеваниях. Также данный отрицательный результат является отличительной особенностью репертуара каталитических антител при шизофрении.



**Рис. 13.** Анализ АТРазной активности IgG методом ТСХ. **А** – Анализ АТРазной активности АТ больных шизофренией; дорожки 1-8 соответствуют 24 ч инкубации 2 мМ АТР в присутствии 0,4 мг/мл IgG сыворотки 8 различных больных шизофренией. Дорожка К – инкубация АТР в отсутствие АТ. **Б** – положительные контроли гидролиза АТР под действием 0,05 мг/мл IgG из крови двух аутоиммунных мышей (дорожки 1 и 2) и sIgA молока здоровых женщин (дорожка 3) в течение 2 ч.

### 3.3.2.3. ДНК-гидролизующая активность IgG

Различные варианты клеточной гибели (апоптоз, некроз, пироптоз, ферроптоз, нетоз) способствуют высвобождению свободных нуклеиновых кислот, а также их комплексов с белками, либо в составе везикул, во внеклеточное пространство и кровотока [387, 388]. При шизофрении обнаружено нарушение процессов апоптотической гибели клеток, что приводит к значительному увеличению концентрации внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови [389, 390]. Также известно, что окислительный стресс способствует апоптозу, а также участвует в высвобождении вкДНК в составе внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs, neutrophil extracellular traps) [391]. Поэтому в условиях окислительного стресса,

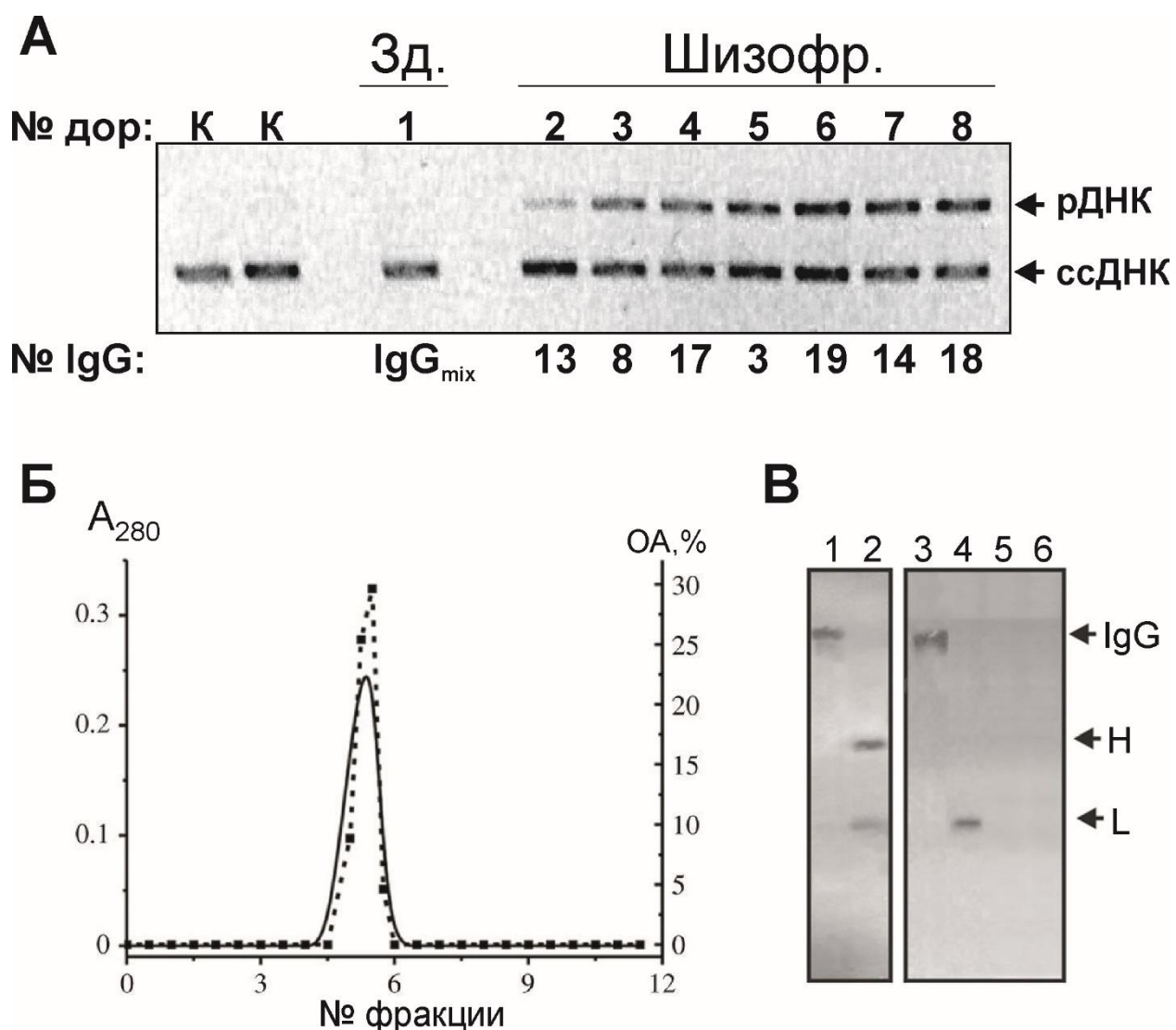
который в частности наблюдается при шизофрении (см. главу 1.1.5), происходит увеличение образования вкДНК, в том числе окисленных форм геномной и митохондриальной ДНК [388]. При этом вкДНК выступает в качестве молекулярного фрагмента, связанного с повреждением клетки (DAMPs) и после распознавания Toll-like рецептором (TLR) 9 стимулирует воспалительные реакции [392]. Доказательством наличия хронических воспалительных реакций при шизофрении является увеличение уровня провоспалительных цитокинов в крови, подтвержденное результатами мета-анализов [129, 130, 131]. Однако вкДНК, особенно в комплексе с ядерными белками, также может выступать в качестве антигена и приводить к образованию анти-ДНК антител [393].

Генерация аутоантител на аутоантигены, включая ДНК, обычно происходит не только у пациентов с аутоиммунными, вирусными и бактериальными заболеваниями, но и у здоровых людей [394]. Однако уровень антител, взаимодействующих с ДНК, у здоровых доноров значительно ниже, чем при аутоиммунных или инфекционных патологиях. Результаты исследований концентрации антител к ДНК при шизофрении достаточно противоречивы. В то время как некоторые исследователи не получили достоверных отличий в уровне антител к обеим формам ДНК [395, 396, 397], другие – отметили повышение содержания антител к ssДНК [398, 399]. Как известно, одним из биомаркеров СКВ являются антитела к dsДНК [400, 401]. Важно отметить, что от 14 % до 75 % пациентов с СКВ испытывают психоневрологические симптомы, включая расстройства настроения и поведения, а также психотические симптомы [402, 403], что также может указывать на связь иммунологических нарушений с развитием психопатологии. Кроме того, известно, что антитела против ДНК могут перекрестно реагировать с NR2 субъединицей NMDA рецептора [404], а также вызывать поведенческие нарушения [405]. Увеличение концентрации аутоантител к ДНК при шизофрении может указывать на нарушение иммунологического гомеостаза.

Как известно, генерация аутоантител сопровождается образованием каталитических антител (см. главу 1.2). Поэтому в работе проанализирована способность IgG расщеплять ДНК. Выделенные на предыдущих этапах препараты IgG, гомогенность которых доказана ранее (см. п. 3.1 и 3.2), использованы для анализа их ДНКазной активности в реакции гидролиза двуцепочечной суперскрученной плазмидной ДНК (ссДНК) pBluescript. В результате проведенного анализа установлено, что IgG здоровых людей обладают очень низкой или недетектируемой ДНКазной активностью (Рис. 14 А, дорожка 1), что согласуется с ранее опубликованными данными [219, 220, 229, 232]. Сыворотка здоровых доноров содержала в низкой концентрации аутоантитела, взаимодействующие с ДНК (см.



Таблицу 7), такие антитела оказались практически неактивными в гидролизе ссДНК. В тоже время препараты IgG пациентов с шизофренией обладали выраженной ДНКазной активностью (Рис. 14 А, дорожки 2–8).

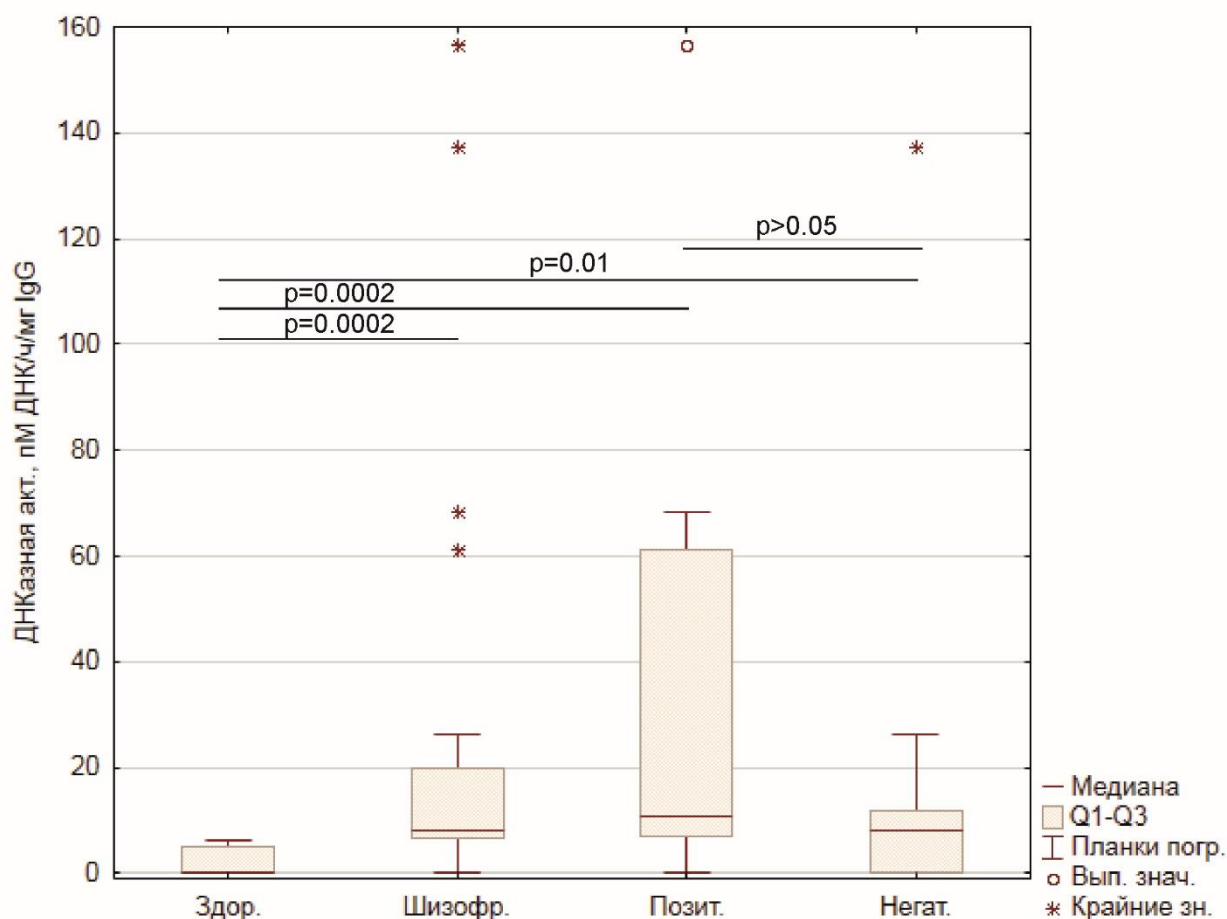


**Рис. 14.** Анализ ДНК-гидролизующей активности IgG больных шизофренией. **А** – анализ продуктов реакции гидролиза двуцепочечной суперскрученной плазмидной ДНК (ссДНК) рVluescript, приводящей к образованию релаксированной плазмидной ДНК (рДНК), в агарозном геле. Дорожки «К» соответствуют ссДНК, инкубированной при 37°С в течение 4 ч без АТ. Дорожка 1 соответствует ссДНК, инкубированной в течение 4 ч в присутствии смеси IgG (0,2 мг/мл) от здоровых доноров (IgG<sub>mix</sub>). На дорожках 2–8 ссДНК инкубирована с препаратами IgG пациентов, номера которых указаны на рисунке. **Б** – гель-фильтрация смеси препаратов IgG больных шизофренией на колонке Superdex 200 в кислом буфере (рН 2,6) и анализ активности в полученных фракциях: (—), оптическая плотность при  $\lambda = 280$  нм ( $A_{280}$ ); (---), относительная активность (ОА) IgG в гидролизе ссДНК. Полный гидролиз 18 мкг/мл ссДНК в течение 2 ч был взят за 100%. **В** – Зимографический анализ ДНКазной активности смеси препаратов IgG больных шизофренией в геле, содержащем сополимеризованную ДНК. На дорожках 3 и 4 нанесены препараты IgG пациентов до и после восстановления ДТТ; на дорожках 5 и 6 нанесена смесь IgG здоровых доноров до и после обработки ДТТ. ДНКазную активность выявляли окрашиванием бромистым этидием в виде темной полосы на флуоресцирующем фоне. Контрольную часть геля окрашивали Coomassie R-250, чтобы показать положение интактных IgG до обработки ДТТ (дорожка 1) и их свободных Н- и L-цепей после обработки ДТТ (дорожка 2).

Чтобы доказать, что регистрируемая эндонуклеазная активность является непосредственным свойством анализируемых IgG, применен ряд разработанных ранее строгих критериев отнесения каталитической активности [155, 394]. Помимо показанной ранее электрофоретической гомогенности анализируемых препаратов IgG (см. рис. 3), выявлено, что гель-фильтрация эквимольной смеси препаратов IgG пациентов (IgG<sub>mix</sub>) в условиях диссоциации нековалентных комплексов в кислом буфере (pH 2,6), не влияет на ДНКазную активность, а пик относительной ДНКазной активности в полученных фракциях совпадает с профилем гель-фильтрации IgG (Рис. 14 **Б**). Отсутствие других пиков на профиле гель-фильтрации, а также прочих пиков относительной ДНКазной активности свидетельствует о гомогенности исследуемых препаратов и о том, что ДНКазной активностью обладают анализируемые IgG.

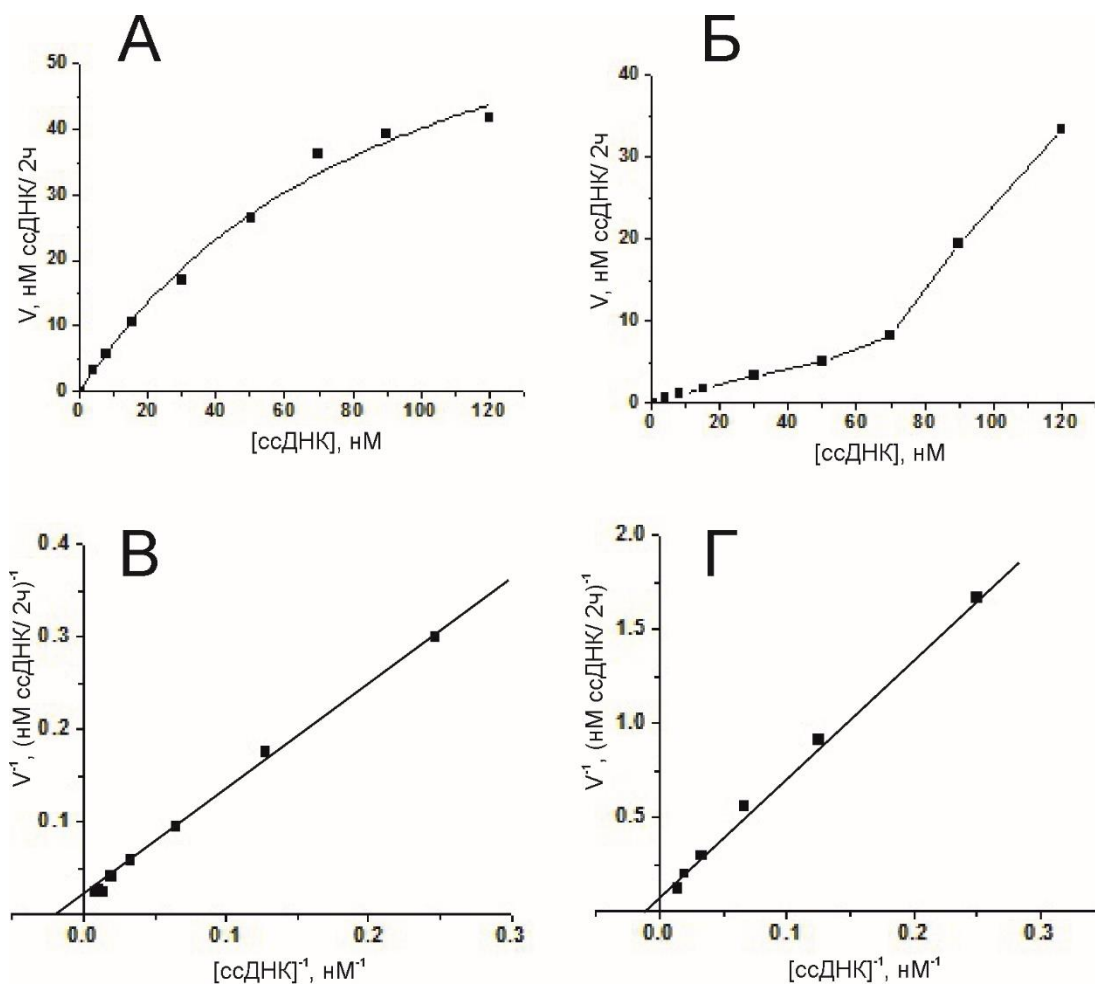
Другим критерием, позволяющим наглядно продемонстрировать, что IgG обладают ДНК-гидролизующей активностью, является зимографический анализ активности *in situ* в SDS-ПААГ, содержащем сополимеризованную ДНК (Рис. 14 **В**). После электрофоретического разделения IgG<sub>mix</sub> в таком геле и окраски бромистым этидием, наличие белков с ДНКазной активностью выявляется по темным полосам на флуоресцирующем фоне. Проведенный зимографический анализ показал, что расщепление ДНК происходило только в областях интактных IgG<sub>mix</sub> пациентов (Рис. 14 **В**, дорожка 3) и в областях легких цепей IgG после их восстановления с помощью ДТТ (дорожка 4). ДНКазной активности IgG<sub>mix</sub> здоровых доноров до (дорожка 5) и после восстановления антител с помощью ДТТ (дорожка 6) не обнаружено, вследствие их низкой активности. Эти данные доказывают, что ДНКазная активность является неотъемлемым свойством IgG больных.

Полученные данные также указывают на то, что активный центр находится в области легкой цепи IgG. Эти данные согласуются с литературными данными о локализации активного центра каталитических IgG с ДНКазной активностью, например, в случае антител больных РС [229]. Можно предположить, что тяжелая цепь IgG больше ответственна за связывание ДНК, в то время как легкая цепь ответственна за каталитическое расщепление ДНК.



**Рис. 15.** Сравнение удельной ДНК-гидролизующей активности препаратов IgG здоровых доноров, общей группы больных шизофренией, а также больных с различной превалирующей симптоматикой. Значимость различий (p) между группами рассчитана с использованием критерия Манна-Уитни.

Из 75-ти полученных аффинной хроматографией препаратов IgG (см. п. 3.1), включенных в исследование, случайным образом отобраны 20 препаратов IgG больных шизофренией и 20 препаратов здоровых доноров. Для количественной оценки ДНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров провели скрининг удельной ДНКазной активности всех препаратов (Рис. 15). Обнаружено, что уровень удельной ДНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией значительно выше уровня активности здоровых доноров ( $p=0,0002$ ), которые практически не обладали активностью (медианное значение активности 0 пМ ДНК/ч/мг IgG). При этом 16 из 20 препаратов IgG пациентов (80%) обладали детектируемой или высокой ДНКазной активностью. При анализе активности в зависимости от преобладающей симптоматики заболевания показано, что удельная активность IgG больных, как с позитивной ( $p=0,0002$ ), так и с негативной симптоматикой ( $p=0,01$ ), значительно выше активности IgG здоровых людей. Однако у больных с различной симптоматикой активность IgG статистически значимо не отличилась ( $p>0,05$ ).



**Рис. 16.** Кинетические параметры гидролиза суперскрученной плазмидной ДНК (ссДНК) pBluescript. **А, Б** – графики зависимости относительных начальных скоростей гидролиза ссДНК от ее концентрации для препаратов больных шизофренией IgG(19) (240 нМ) и IgG(6) (33 нМ) соответственно. **В, Г** – графики зависимости относительных начальных скоростей ДНКазной реакции от концентрации ссДНК в координатах Лайнуивера-Берка для препаратов IgG(19) и IgG(6). Погрешность определения начальной скорости из двух экспериментов при каждой концентрации субстрата не превышала 7–12%.

Для оценки сродства каталитических антител к ДНК для трех препаратов IgG пациентов оценены кинетические зависимости начальных скоростей реакции гидролиза от концентрации плазмидной ДНК. Полученная зависимость соответствует кинетике Михаэлиса-Ментен (Рис. 16). В случае препарата IgG(19) значения  $K_m$  и  $k_{cat}$  составили:  $K_m = 95,0 \pm 18,0$  нМ,  $k_{cat} = (2,7 \pm 0,3) \times 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>. IgG(1) продемонстрировал примерно такое же значение  $K_m = 85,0 \pm 12,0$  нМ, но более высокое значение  $k_{cat} = (7,9 \pm 0,5) \times 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>. IgG(6) продемонстрировал (при тех же условиях) более сложные зависимости, соответствующие сумме двух гиперболических кривых насыщения каталитического антитела ДНК-субстратом (Рис. 16 **Б, Г**). Первая гиперболическая кривая соответствует  $K_m = 80,0 \pm 12,0$  нМ и  $k_{cat} = (3,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>, тогда как в случае второй части зависимости, соответствующей меньшему значению  $K_m$  и более высокому значению  $k_{cat}$

определить эти значения не удалось (Рис. 16 **Б, Г**). Полученные значения  $K_m$  указывают на высокую аффинность IgG пациентов к субстрату (ссДНК) и соответствуют типичным значениям  $K_m$  (и  $K_d$ ) для взаимодействий антиген-антитело. Однако полученные значения  $K_m$  оказались на 3–4 порядка ниже, чем значения  $K_m$ , характеризующие сродство ДНКазы I к ссДНК ( $K_m = 46\text{--}58$  мкМ) [406]. Тем не менее, значения  $K_m$  препаратов IgG больных шизофренией оказались схожими со значениями  $K_m$  для IgG пациентов с СКВ [406]. Полученные значения  $k_{cat}$  оказались в  $10^2\text{--}10^3$  раз ниже, чем самые высокие значения  $k_{cat}$  для препаратов больных СКВ, гидролизующих ссДНК [406], но в тоже время оказались сопоставимыми со значениями  $k_{cat}$  препаратов IgG пациентов с клещевым энцефалитом [318] и вирусным гепатитом [257]. Полученные результаты также согласуются с литературными данными о более высоком сродстве абзимов к субстрату по сравнению с каноническими ДНКазами [155, 394]. Этим объясняются более низкие значения  $k_{cat}$  препаратов IgG пациентов, по сравнению с ДНКазами, поскольку высокое сродство продлевает время существования комплекса антитело-субстрат и, как следствие, снижает число оборотов катализатора. Аффинность связывания зависит от количества связей, образованных между ферментом (антителом) и субстратом (антигеном) [407], и, соответственно, определяется аминокислотными остатками, входящими в состав фрагментов вариабельного участка антитела, которые связывают специфический антиген (complementarity-determining regions, CDRs). Аминокислотные остатки, входящие в состав различных CDRs, также формируют активный центр абзима. Можно предположить, что в некоторые CDRs включаются основные аминокислотные остатки для связывания ДНК, а в другие CDRs встраиваются нуклеофильные остатки (характерные для нуклеаз) участвующие в катализе, однако механизм, обеспечивающий встраивание таких аминокислот и формирование активного центра на легкой цепи IgG (как установлено в данной работе), пока остается неизвестным.

Таким образом, в данной части работы показано, что при шизофрении 80% IgG пациентов с шизофренией обладают ДНК-гидролизующей активностью. В то же время известно, что при СКВ 90–95%, а при РС 85–90% антител эффективно гидролизуют ДНК [394]. Эти данные указывают на некоторые общие механизмы, связанные с образованием ДНК-гидролизующих антител, в патогенезе этих заболеваний.

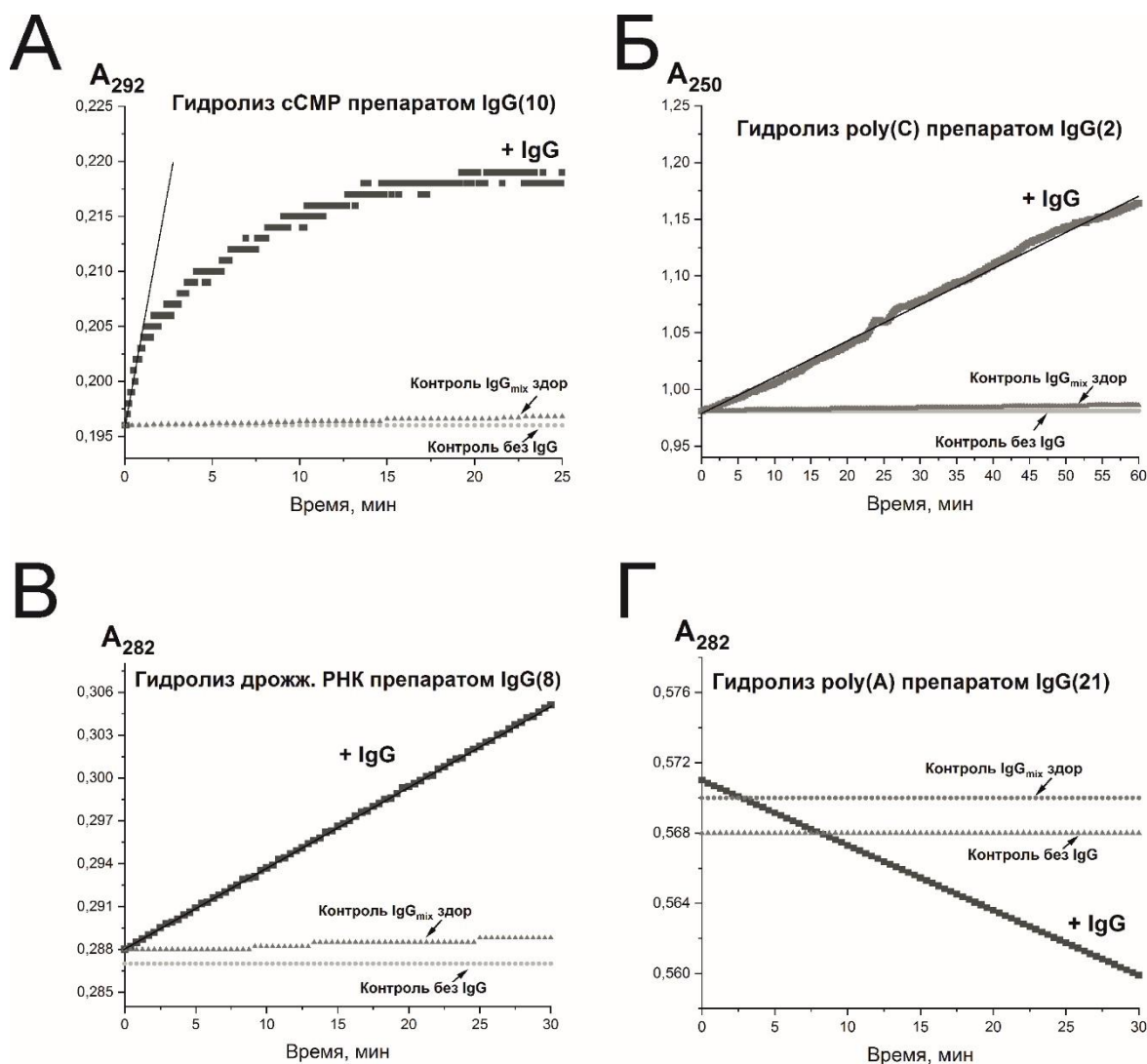
Как указано выше, дисфункция апоптоза может способствовать высвобождению вкДНК, и провоцировать воспалительные реакции после ее распознавания TLR9. Кроме того нейтрофилы, выделяющие NETs в процессе нетоза, также могут являться источником аутоантигенов [408]. NETs, содержащие компоненты хроматина, активируют комплемент, что ингибирует деградацию NETs и способствует продукции анти-ядерных аутоантител

[408]. Таким образом, белки крови, проявляющие ДНК-гидролизующую активность, являются важным фактором, ответственным за снижение концентрации вкДНК и минимизацию воспалительных и аутоиммунных реакций [387]. Известно, что концентрации вкДНК в крови обратнопропорциональна общему уровню ДНКазной активности сыворотки крови [409]. Исходя из этих данных можно предположить, что образование антител с ДНК-гидролизующей активностью при шизофрении является компенсаторной реакцией на увеличение уровня вкДНК в крови. Такие антитела наряду с ДНКазами крови могут участвовать в удалении вкДНК, способствуя снижению воспалительных реакций.

Однако учитывая структурную схожесть ДНК и РНК, а также перекрестную реактивность антител к этим молекулам [221], необходимо было исследовать способность антител гидролизовать РНК.

#### 3.3.2.4. РНК-гидролизующая активность антител

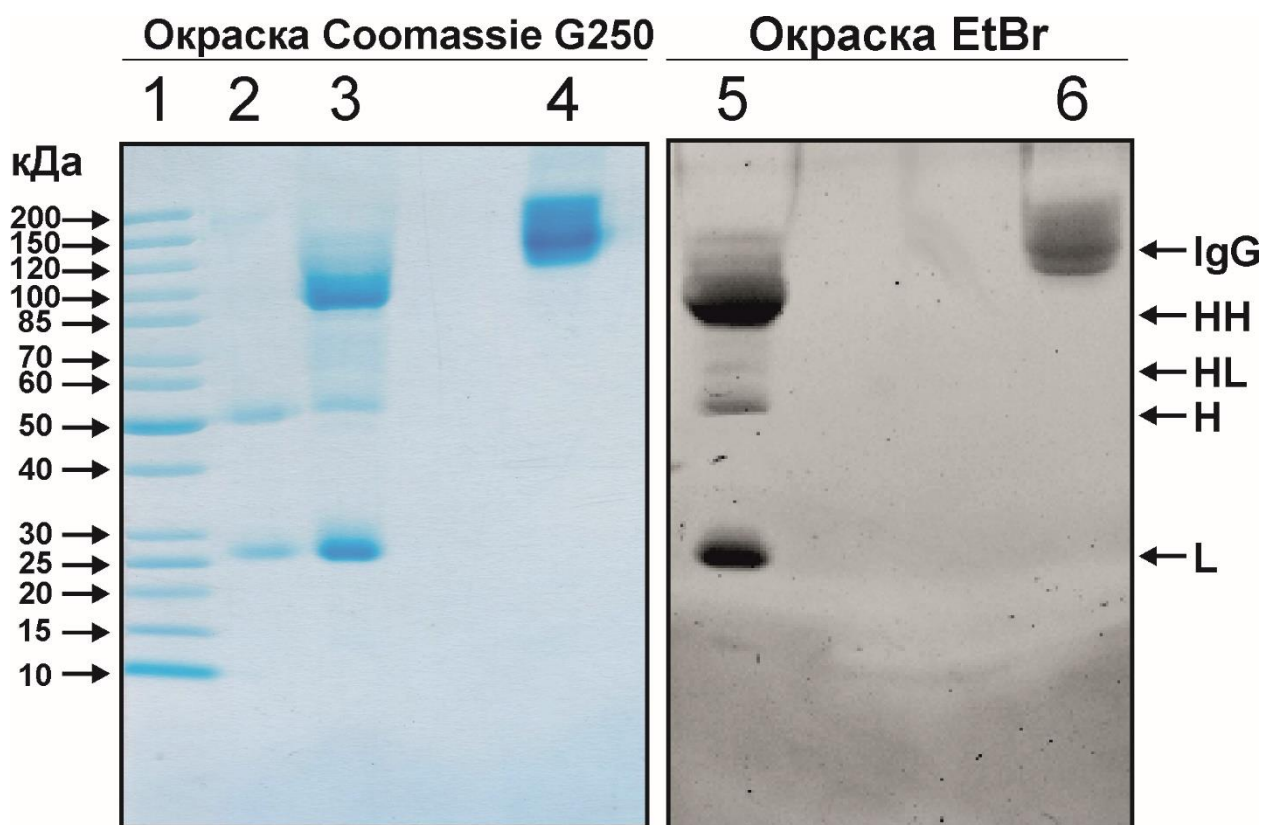
Способность антител гидролизовать как ДНК, так и РНК показана при РС, СКВ и других заболеваниях [221, 228, 245]. Причем в случае РС и СКВ активность IgG оказалась сопоставимой и даже выше активности РНКазы А [221, 228]. Для исследования РНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией использовали модельные субстраты для РНКаз, гидролиз которых регистрировали спектрофотометрическим методом (см. п. 2.2.7.4). Гидролиз этих субстратов приводит к изменению оптической плотности реакционной смеси: увеличению плотности при гидролизе сСМР, poly(C), суммарной дрожжевой РНК, и уменьшению – при гидролизе poly(A) [208, 209, 221, 325, 326]. С помощью этого метода оценена РНКазная активность выделенных на предыдущих этапах препаратов IgG пациентов и здоровых доноров (см. п. 3.1). Несколько типичных примеров графиков изменения оптической плотности при гидролизе модельных субстратов под действием IgG приведены на рис. 17. Из представленных данных видно, что различные препараты IgG больных шизофренией эффективно гидролизуют РНК-субстраты, в то время как смесь IgG здоровых доноров (IgG<sub>mix</sub> здор) приводила к незначительному изменению оптической плотности, соответственно эти IgG практически не обладали РНКазной активностью. Аналогичные зависимости получены для всех 35-ти проанализированных препаратов IgG пациентов и 20-ти здоровых доноров. Полученные данные об отсутствии РНКазной активности препаратов IgG здоровых людей согласуются с литературными данными [208, 209].



**Рис. 17.** Типичные кинетические графики зависимости изменения оптической плотности раствора от времени при гидролизе различных субстратов под действием различных препаратов IgG больных шизофренией: **А** – гидролиз сСМР препаратом IgG(10); **Б** – гидролиз poly(C) препаратом IgG(2); **В** гидролиз дрожжевой РНК препаратом IgG(8); **Г** – гидролиз poly(A) препаратом IgG(21). В каждом случае в качестве контроля использовали реакционную смесь, содержащую смесь препаратов IgG здоровых доноров (IgG<sub>mix</sub> здоров), а также смесь, не содержащую IgG. Линейные участки зависимости изменения оптической плотности от времени реакции показаны сплошной черной линией.

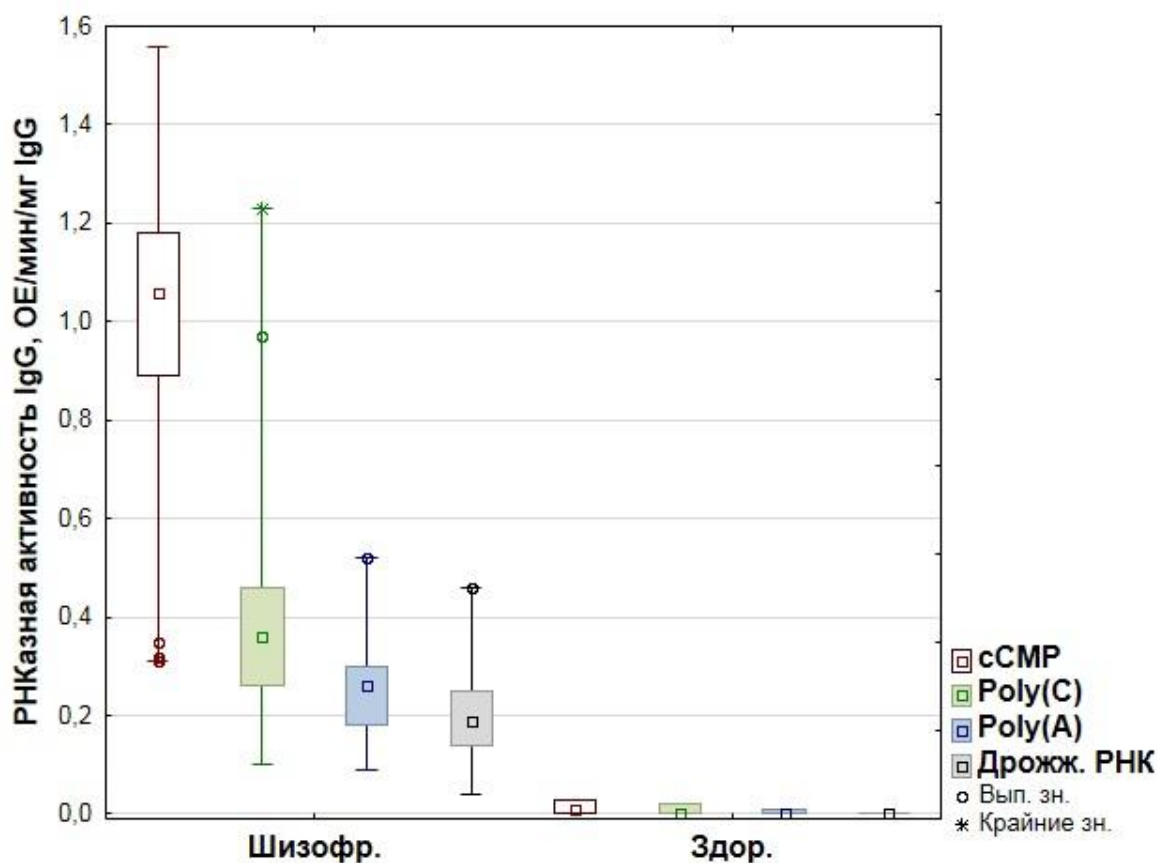
Для доказательства, что наблюдаемая РНКазная активность является неотъемлемым свойством анализируемых IgG, а не является следствием теоретически возможного присутствия канонических РНКаз, использовали разработанный ранее строгий и наглядный критерий отнесения каталитической активности – зимографический анализ РНКазной активности (Рис. 18). Предварительно в геле, содержащем сополимеризованную полимерную РНК дрожжей, электрофоретически разделяли IgG пациентов, а затем регистрировали гидролиз РНК по темным пятнам на флуоресцирующем фоне после окраски бромистым этидием (см. п. 2.2.4.3). Положение

анализируемых белков устанавливали после окраски Coomassie G250 идентичной половины геля. В результате установлено, что исчезновение окраски, вызванное гидролизом РНК, происходит в области геля, соответствующей положению интактных IgG (Рис. 18, дорожка 6). На дорожке с антителами, предварительно обработанными ДТТ, гидролиз субстрата произошел в областях, соответствующих фрагментам полного или частичного восстановления дисульфидных связей IgG: HH-, HL-фрагменты, H- и L- цепи (Рис. 18, дорожка 5). Молекулярная масса, сывороточных РНКаз человека значительно отличается от массы IgG и их фрагментов [410], следовательно, их электрофоретическая подвижность не может совпадать. Поэтому полученные результаты, во-первых, доказывают, что анализируемые препараты больных обладают РНКазной активностью, а во-вторых, что активность проявляют как легкие, так и тяжелые цепи иммуноглобулинов.



**Рис. 18.** Зимографический анализ РНК-гидролизующей активности смеси препаратов IgG больных шизофренией в геле, содержащем дрожжевую РНК. РНК-гидролизующую активность выявляли по появлению темных полос на флуоресцирующем фоне после окраски бромистым этидием (EtBr, правая часть геля, дорожки 5–6). Положения белков устанавливали окрашиванием геля Coomassie R-250 (левая часть геля, дорожки 1–4). Дорожка 1 соответствует маркерам молекулярной массы белков. На дорожке 2 нанесены IgG, инкубированные при 100 °С с ДТТ. Дорожки 3 и 5 соответствуют IgG, инкубированным с ДТТ при 37 °С. Дорожки 4 и 6 – интактные IgG. Фрагменты частичного восстановления дисульфидных связей IgG (H-, L- фрагменты) указаны стрелками: H – тяжелая цепь IgG, L – легкая цепь IgG.

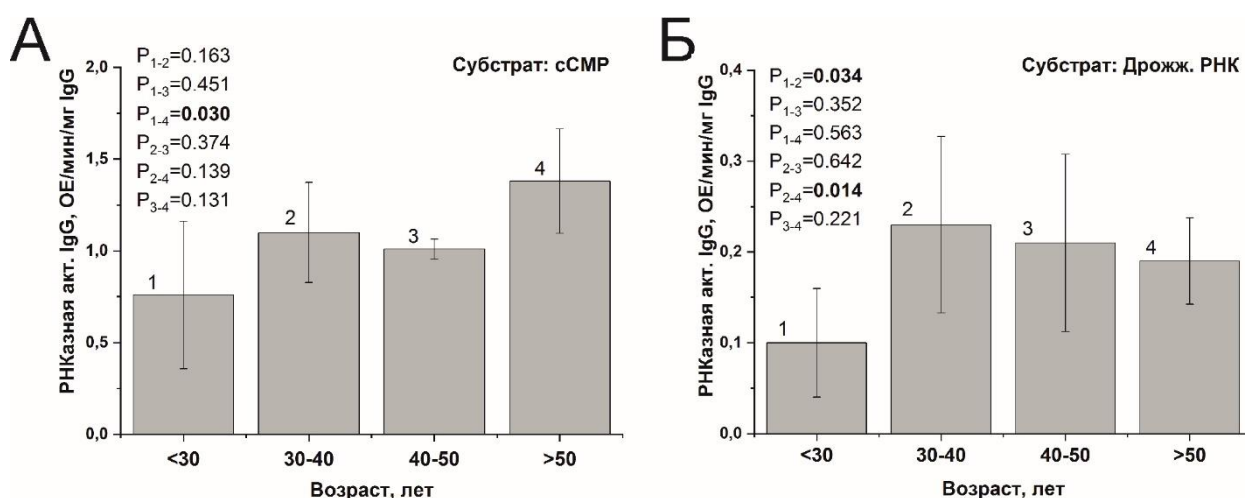




**Рис. 19.** Сравнение удельной РНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров на различных модельных субстратах. На диаграммах «ящик с усами» представлены медианные значения активности (□), значения первого и третьего квартиля (границы ящика), а также минимальное и максимальное значения (верхний и нижний усы). Во всех случаях различия между группами здоровых доноров и больных шизофренией, рассчитанные по критерию Манна-Уитни, статистически значимы ( $p < 0,01$ ).

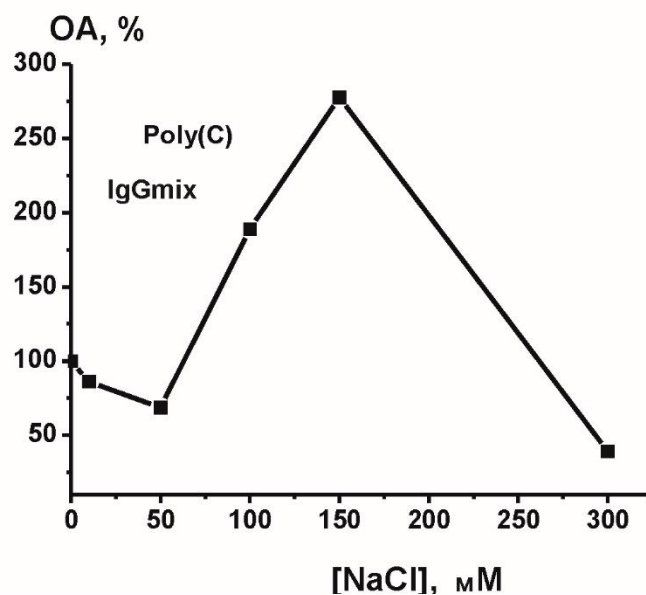
Анализ удельной РНКазной активности показал, что все 35 образцов IgG (100%) демонстрировали тестируемую или высокую РНКазную активность (Рис. 19), в то время как препараты IgG здоровых доноров практически не гидролизывали РНК (медианное значение 0 ОЕ/мин/мг IgG). Эффективность гидролиза модельных субстратов РНК в используемых условиях реакции уменьшалась в ряду: cCMP > poly(C) > poly(A) > суммарная дрожжевая РНК. Значения удельной РНКазной активности IgG больных шизофренией составили (медианное значение; IQR, ОЕ/мин/мг IgG): cCMP (1,06; 0,24), poly(C) (0,36; 0,19), poly(A) (0,26; 0,12), суммарная дрожжевая РНК (0,19; 0,11). Примечательно, что уровень РНКазной активности IgG при гидролизе cCMP отрицательно коррелировал с уровнем гидролиза poly(C) ( $r = -0,599$ ,  $p < 0,05$ ). Однако других значимых корреляций РНКазной активности при гидролизе остальных субстратов не выявлено. При анализе корреляции уровней РНКазной активности IgG пациентов с общими клиническими показателями обнаружено, что РНКазная активность IgG при гидролизе cCMP положительно коррелировала с возрастом больных ( $r = 0,369$ ,  $p < 0,05$ ).

Других корреляций с клиническими данными не выявлено. Результаты корреляционного анализа подтверждаются данными уровней РНКазной активности при разделении больных на подгруппы в зависимости от возраста (Рис. 20 А). В частности, показано, что уровень РНКазной активности при гидролизе сСМР возрастает с увеличением возраста и в группах пациентов с возрастом <30 лет значительно отличается от группы в возрасте >50 лет (Рис. 20 А). Однако другая зависимость наблюдалась в случае гидролиза дрожжевой РНК. Уровень активности значительно отличался между больными в возрасте <30 лет и пациентами в возрасте 30–40 лет, а также между подгруппами в возрасте 30–40 лет и >50 лет (Рис. 20 Б). Значимые отличия уровня активности в подгруппах с различной длительностью заболевания не обнаружены.



**Рис. 20.** Зависимость уровня удельной РНКазной активности препаратов IgG от возраста больных. А, Б – РНКазная активность на субстратах сСМР и дрожжевая РНК соответственно. Представлены медианные значения активности в различных группах. Достоверность различий (р) между группами, рассчитанная по критерию Манна-Уитни, указана на рисунке.

На уровень активности канонических РНКаз, как известно, влияет ионная сила раствора [410]. Поэтому далее проанализирована зависимость уровня РНК-гидролизующей активности от ионной силы раствора реакционной смеси с использованием субстрата poly(C) (Рис. 21). Как видно из приведенного графика, с увеличением концентрации NaCl в растворе poly(C)-гидролизующая РНКазная активность смеси IgG пациентов растет, достигает максимума при концентрации NaCl 150 мМ, а затем снижается. Как известно, раствор, содержащий 150 мМ NaCl, является изотоническим раствором с ионной силой, характерной для плазмы крови (~0,15 моль/кг). Важно отметить, что при увеличении концентрации NaCl от 50 до 300 мМ активность РНКазы 1 панкреатического типа возрастает, в то время как активность РНКазы 2 непанкреотического типа при концентрациях NaCl более 150 мМ значительно снижается [410]. Следовательно, ферментативные свойства анализируемых IgG отличаются от свойств канонических РНКаз.



**Рис. 21.** Зависимость эффективности гидролиза poly(C) под действием IgG<sub>mix</sub> больных шизофренией от ионной силы раствора. OA – относительная РНКазная активность.

Таким образом, обнаружено, что препараты IgG больных шизофренией способны гидролизовать не только ДНК, но и РНК. Важно отметить, что РНКазной активностью обладали 100% препаратов IgG пациентов, в то время как ДНК-гидролизующая активность выявлена у 80% больных. Кроме того, показано, что РНКазную активность проявляют как легкие, так и тяжелые цепи IgG, а ДНК-гидролизующей активностью обладали только легкие цепи иммуноглобулинов. Интересна также способность IgG с РНКазной активностью гидролизовать сСМР. Как известно, гидролиз РНК происходит в две стадии, на первой из которых образуется 2',3'-циклонуклеотид, а на второй происходит его гидролиз [410]. Однако, некоторые ферменты, например, РНКазы 2 и 3 непанкреатического типа не способны гидролизовать сСМР [410]. Это объясняется строением их активного центра. В отличие от РНКазы А, в которой взаимодействие между His-119 и Asp-121 приводит к стабилизации протонированной формы His-119, участвующего в катализе [411], у этих РНКаз в 122 положении находятся основные аминокислотные остатки, которые мешают His-119 протонированию и осуществлению катализа [410]. Поэтому можно предположить важную роль остатков His и Asp в активном центре IgG с сСМР-гидролизующей РНКазной активностью. Интересно, что все известные каталитические антитела при аутоиммунных заболеваниях способны гидролизовать сСМР [228]. Однако спектрофотометрический метод не позволяет идентифицировать продукты гидролиза олигорибонуклеотидов, поэтому на дальнейшем этапе проанализирована способность IgG гидролизовать короткие олигорибонуклеотиды, а также микроРНК.

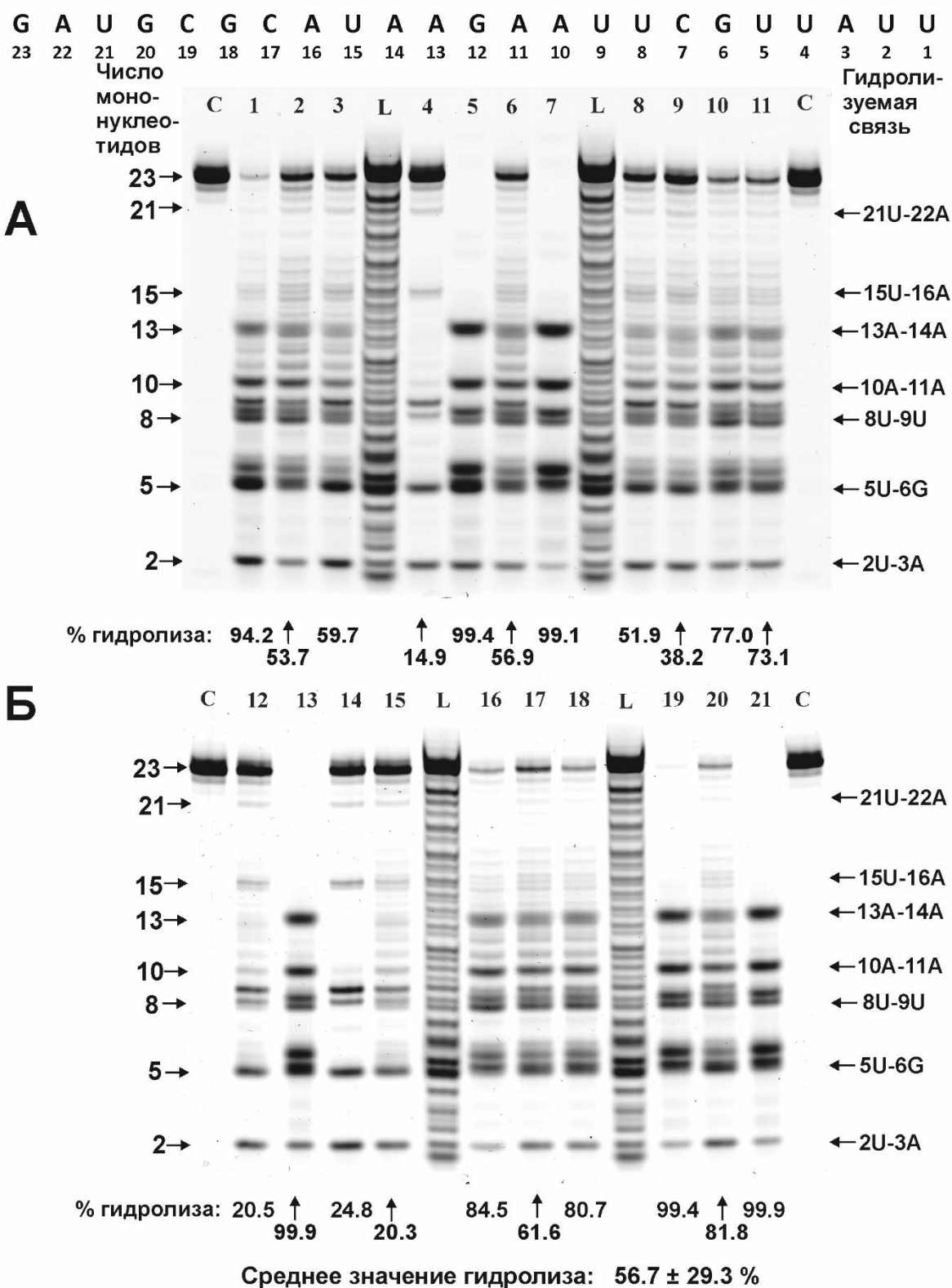
### 3.3.2.5. Гидролиз микроРНК антителами больных шизофренией

МикроРНК (miR) представляют собой класс небольших консервативных некодирующих РНК, которые регулируют посттранскрипционную экспрессию генов. Многие микроРНК динамически регулируются во время развития ЦНС и экспрессируются в различных областях во взрослом мозге, что указывает на их важную роль в функционировании ЦНС [412]. Известно, что микроРНК может высвобождаться из клетки в составе экзосом, или транспортироваться в составе комплексов с различными белками (липопротеины высокой плотности, или РНК-связывающие белки). Как указано в п. 1.1.3, при шизофрении наблюдается дисрегуляция экспрессии микроРНК как в различных областях мозга, так и в клетках и плазме периферической крови [59]. Кроме того обнаружено снижение соотношения зрелой микроРНК и первичного транскрипта [67], что может быть связано с нарушением некоторых этапов синтеза, либо разрушением зрелой микроРНК, либо ее предшественников.

Для анализа РНК-гидролизующей активности IgG пациентов с шизофренией отобран ряд нейроспецифических микроРНК (miR-137, miR-9-5p, miR-219-2-3-p и miR-219-5p) [412, 413], которые регулируют экспрессию генов клеток нервной системы и играют важную роль в развитии шизофрении. В частности, miR-137 участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки предшественников нервных клеток, miR-9-5p регулирует рост и ветвление отростков нейронов, miR-219-2-3-p и miR-219-5p вовлечены в регуляцию синаптогенеза и синаптической пластичности [59, 67, 412, 413]. Дисрегуляция этих микроРНК показана при шизофрении (см. п. 1.1.3). Кроме того, среди этих микроРНК miR-9-5p также участвует в регуляции воспаления. Показано, что miR-9-5p ингибирует активацию инфламмосомы NLRP3 [414], а также участвует в регуляции экспрессии ядерного фактора каппа-В (NF-κB). Кроме того, miR-219-5p и miR-219-2-3-p связаны с регуляцией программ эндогенного разрешения воспаления [415]. Учитывая связь шизофрении с развитием вялотекущего воспаления [131], дисрегуляция этих микроРНК имеет важное значение в патогенезе заболевания.

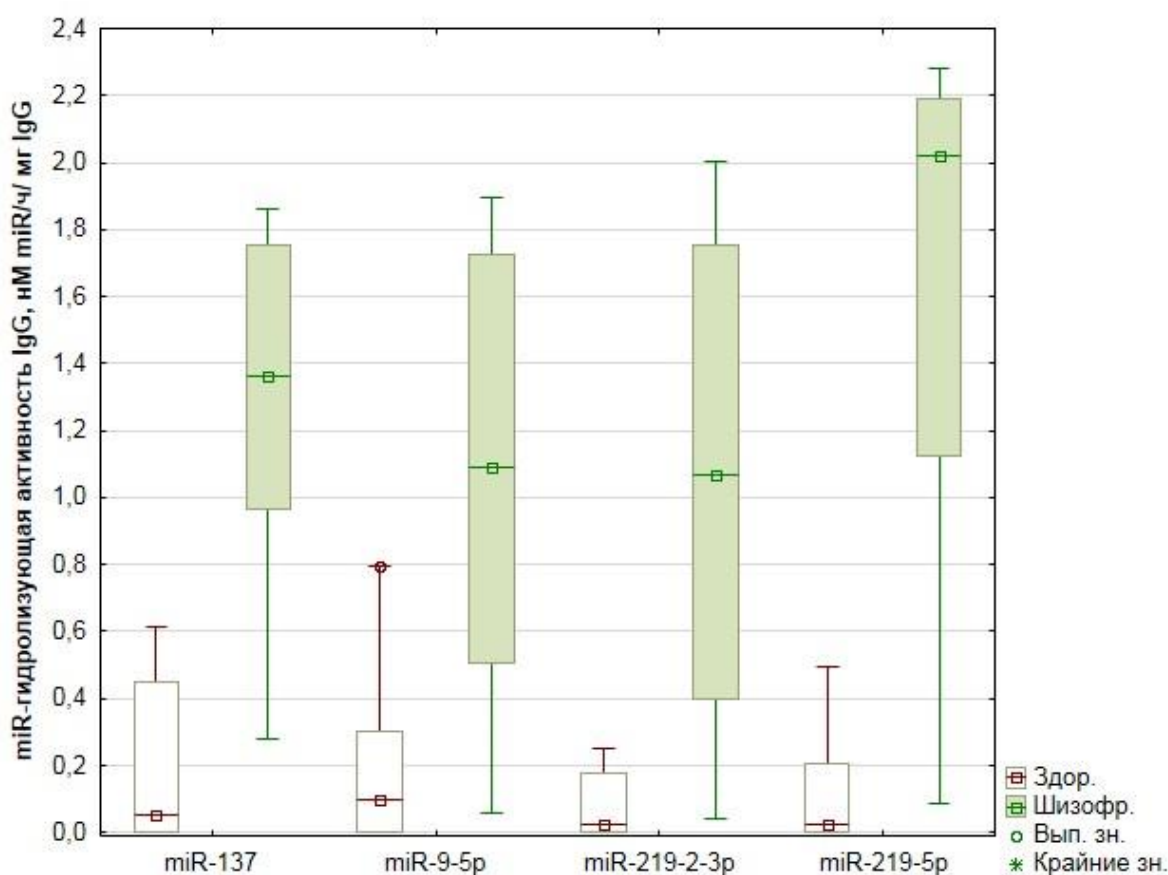
Для анализа микроРНК-гидролизующей активности использовали флуоресцентно-меченые микроРНК (Таблица 3). Продукты гидролиза анализировали электрофорезом в денатурирующих условиях (см. п. 2.4.5). На рис. 22 (а также в Приложении, Рис. П 1–П 3) приведены типичные паттерны гидролиза miR-137, miR-9-5p, miR-219-2-3-p и miR-219-5p, а также процент их гидролиза каждым из IgG и средний процент гидролиза 21 препаратом.

## Нуклеотидная последовательность miR-137



**Рис. 22.** Паттерны гидролиза miR-137 под действием IgG пациентов с шизофренией. А, Б – анализ продуктов реакции гидролиза miR-137 в 20% ПААГ в денатурирующих условиях под действием IgG. Дорожка С – контрольная реакционная смесь, не содержащая IgG. Дорожки 1-21 – реакционные смеси, содержащим IgG различных пациентов. Дорожки L – маркеры фрагментов miR-137 различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

Установлено, что все препараты IgG больных шизофренией обладают микроРНК-гидролизующей активностью. Процент гидролиза микроРНК различными препаратами IgG в одинаковых условиях отличался, а медианные значения уменьшались в следующем порядке: miR-219a-5p (диапазон: 7,4–99,7%; медиана [IQR] = 88,4 [46,6]%) > miR-137 (14,9–99,9%; 73,1 [42,2]%) > miR-9-5p (3,1–99,9%; 57,5 [64,2]%) miR-219a-2-3p (7,4–99,7%; 53,2 [67,7]%) (Рис. 22 и рис. П 1–П 3 Приложения). Таким образом, наиболее эффективно гидролизовалась miR-219a-5p, а менее эффективно miR-219a-2-3p. Важно отметить, что препараты IgG здоровых доноров также обладали детектируемой, но низкой активностью в гидролизе микроРНК. Удельная микроРНК-гидролизующая активность IgG пациентов оказалась значительно выше ( $p < 0,0008$ ), чем активность IgG здоровых людей (Рис. 23).



**Рис. 23.** Сравнение уровня удельной микроРНК-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров для четырех нейроспецифических микроРНК. На диаграммах «ящик с усами» представлены медианное значение активности ( $\square$ ), значения первого и третьего квартиля (границы ящика), а также минимальное и максимальные значения (верхний и нижний усы). Во всех случаях различия между группами здоровых доноров и больных шизофренией, рассчитанные по критерию Манна-Уитни, статистически значимы ( $p < 0,0008$ ).

Используемый метод позволяет не только определить процент гидролиза, но и идентифицировать все сайты гидролиза микроРНК. Для точной идентификации продуктов гидролиза использовали маркеры фрагментов микроРНК известной длины, полученные ограниченным щелочным гидролизом или статистическим гидролизом РНКазой T1 (см.

п. 2.4.5). Также, поскольку при гидролизе РНК на первой стадии образуются 2',3'-циклонуклеотиды, обладающие меньшей подвижностью, для некоторых фрагментов видны две полосы на представленных элетрофореграммах (Рис. 22 и рис. П 1–П 3 Приложения). Чтобы идентифицировать такие фрагменты, в некоторых случаях их обрабатывали FastAP-термочувствительной щелочной фосфатазой (см. п. 2.4.5). В результате проделанной работы и анализа полученных фрагментов установлено, что гидролиз всех микроРНК оказался в основном сайт-специфическим. Основные и умеренные сайты гидролиза каждой микроРНК для большинства препаратов IgG совпадали, однако некоторые из них обнаружили другие специфические сайты расщепления. Несколько индивидуальных препаратов IgG пациентов гидролизовали некоторые микроРНК неспецифично почти по всем межнуклеозидным связям, другие демонстрировали комбинацию сайт-специфического и неспецифического расщепления. Основные сайты гидролиза микроРНК под действием IgG здоровых доноров совпадали с сайтами гидролиза под действием IgG пациентов. Расщепление в основных сайтах гидролиза четырех микроРНК чаще происходило до или после G основания, хотя есть и другие варианты: miR-137 – 5U–6G, 8U–9U и 10A–11A (Рис. 22); miR-9-5p – 6G–7G, 8U–9U и 13U–14A (Рис. П 1 Приложения); miR-219a-2-3p – 5U–6U, 8U–9G и 13G–14G (Рис. П 2); miR-219a-5p – 6G–7U, 13C–14G и 8C–9C (Рис. П 3). Однако, четкой специфичности к пуриновым или пиримидиновым нуклеотидам не обнаружено.

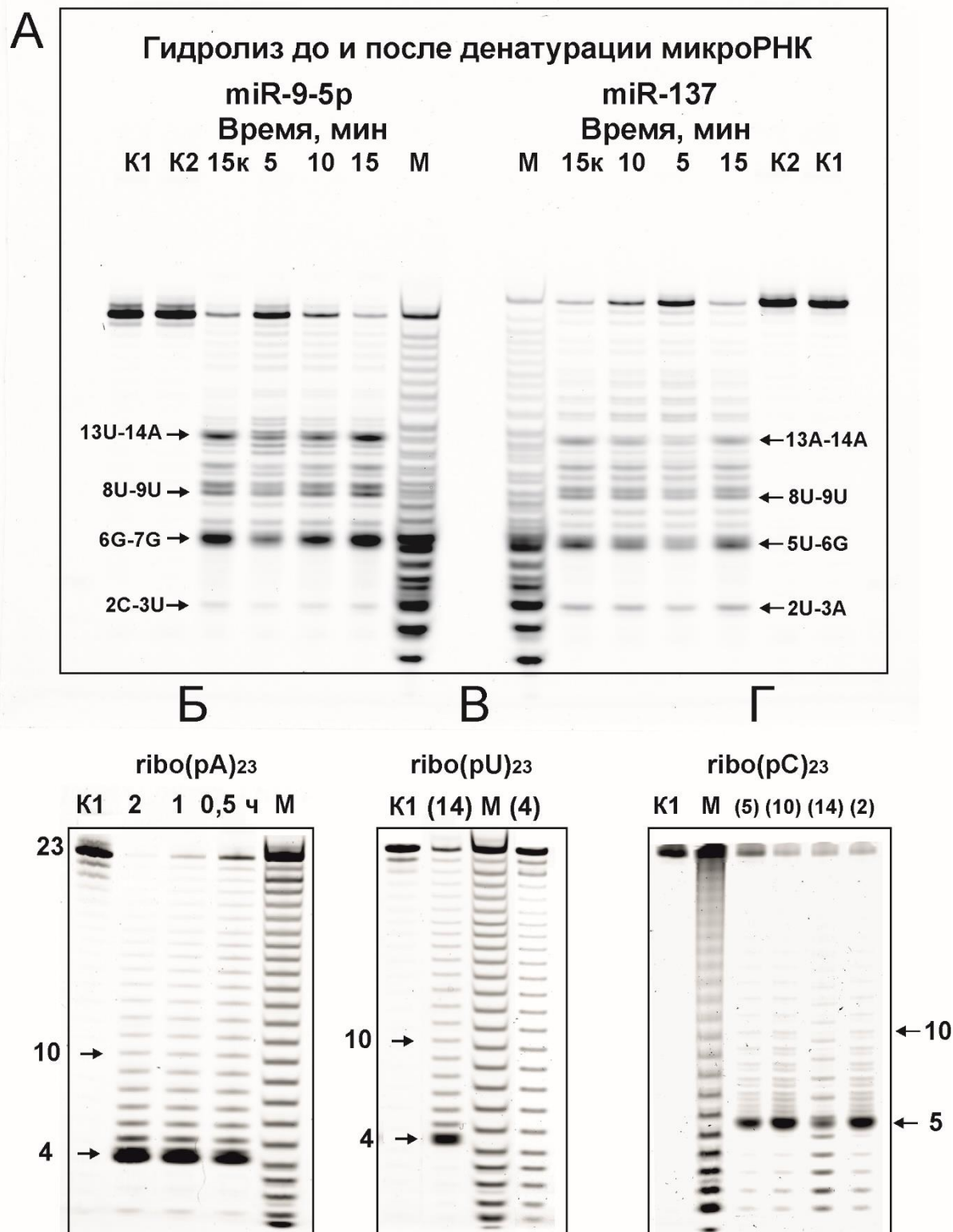
Известно, что короткая РНК может существовать в растворе в виде одноцепочечной, шпилечной и димерной формах, которые находятся в термодинамическом равновесии [416]. Разнообразие образующихся продуктов реакции гидролиза микроРНК может объясняться множеством возможных вариантов форм микроРНК в растворе. Рассчитанные двумерные и трехмерные шпилечные структуры микроРНК с минимальной свободной энергией представлены на Рис. П 4 и П 5 (см. Приложение). Установлено, что основные сайты гидролиза всех микроРНК расположены в их петлях или дуплексных участках, примыкающих к петлям (Рис. П 4). В некоторых случаях сайты гидролиза совпадают с областями конформационного напряжения (Рис. П 5). Кроме того, образующиеся продукты гидролиза также могут взаимодействовать с одноцепочечными цепями микроРНК, приводя к образованию гетеродимеров. Полученные данные позволяют предположить, что IgG лучше связываются с димерными участками, но гидролизуют соседние одноцепочечные области. Таким образом, обнаруженные паттерны расщепления могут объясняться разнообразием конформационных форм микроРНК в растворе.

Для детальной оценки специфичности РНК-гидролизующих IgG к пространственной структуре микроРНК, исследовано влияние денатурации микроРНК на наблюдаемые

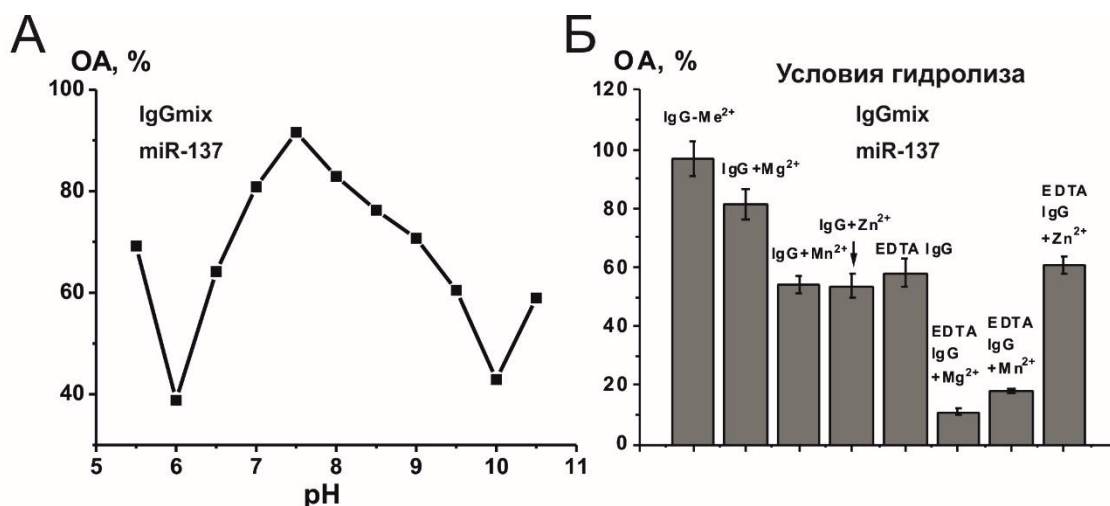
паттерны гидролиза. В качестве примера на рис. 24 *А*, приведены типичные паттерны гидролиза miR-9-5p и miR-137 под действием IgG(13) до и после их денатурации. Видно, что мажорные сайты гидролиза этих микроРНК после денатурации сохраняются. Незначительные отличия наблюдаются в относительном количестве продуктов гидролиза. Однако главное отличие состоит в том, что в случае денатурированных микроРНК наблюдается небольшое увеличение продуктов гидролиза с длиной от 22 до 14 нуклеотидных звеньев. Полученные данные указывают на то, что расщепление микроРНК по мажорным сайтам в большей степени зависит от их последовательности, чем от их пространственной структуры.

Представлялось интересным, по каким сайтам будет происходить расщепление гомоолигорибонуклеотидов той же длины. На рис. 24 *Б–Г* в качестве примера приведены типичные паттерны гидролиза r(pA)<sub>23</sub>, r(pU)<sub>23</sub> и r(pC)<sub>23</sub> некоторыми препаратами IgG. В отличие от специфических микроРНК, наблюдался более выраженный неспецифический гидролиз по всей длине этих гомоолигонуклеотидов, за исключением сайта между звеньями 4–5 для r(pA)<sub>23</sub> и r(pU)<sub>23</sub>, а также звеньями 5–6 r(pC)<sub>23</sub> с 5'-конца. Эти сайты оказались единственными мажорными в случае всех использованных препаратов IgG. Важно отметить, что конечными мажорными продуктами гидролиза в случае всех микроРНК также являются фрагменты длиной 5–6 нуклеотидов (Рис. 22, и рис. П 1 – П 3). Ранее показано, что легкая цепь анти-ДНК IgG образует сильные контакты только с 4–5 нуклеотидными звеньями олигонуклеотидов [417]. Вклад в сродство других звеньев резко уменьшается, и при  $n > 8-9$  все зависимости сродства от длины олигонуклеотидов достигают плато. Учитывая это, можно предположить, что легкие цепи узнают с большей эффективностью 4–6 5'-концевых звеньев любых РНК. Это может быть основной причиной образования мажорных фрагментов гидролиза длиной 4–6 звеньев. В то же время образование более длинных продуктов гидролиза с меньшей эффективностью может свидетельствовать о возможности формирования комплексов легких цепей с различными удаленными от 5'-конца фрагментами изучаемых олигонуклеотидов и микроРНК. При этом в случае микроРНК есть другие менее мажорные, но ярко выраженные сайты гидролиза (Рис. 22, и рис. П 1 – П 3), что может указывать на альтернативные возможности связывания специфических РНК с антителами. Кроме того, нельзя исключить, что к образованию мажорных фрагментов гидролиза длиной 4–6 звеньев может приводить связывание и последующий гидролиз любых РНК-субстратов различными абзимами, специфическими и неспецифическими к последовательностям РНК. Тем не менее, образование некоторых мажорных продуктов гидролиза микроРНК, скорее всего, связано с их гидролизом специфическими антителами против этих РНК.



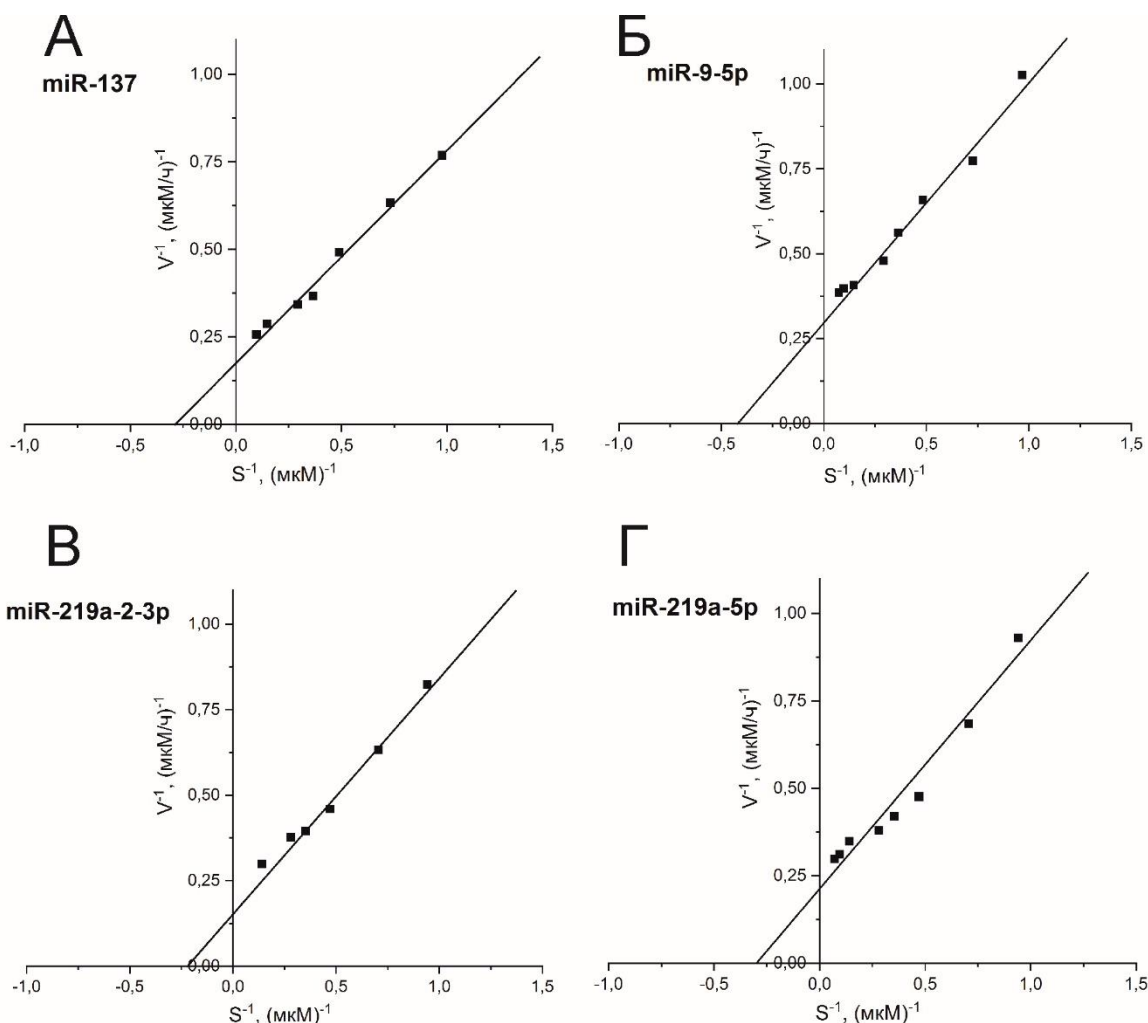


**Рис. 24.** Паттерны гидролиза гомоолигорибонуклеотидов, а также микроРНК до и после денатурации. **А** – паттерны гидролиза miR-9-5p и miR-137 под действием IgG(13) до и после денатурации микроРНК. Продукты гидролиза определяли электрофорезом после инкубации смесей в течение 5–15 мин; на дорожке 15к нанесена реакционная смесь с IgG, содержащая микроРНК до их денатурации, инкубированная 15 мин. **Б, В, Г** – паттерны гидролиза r(pA)<sub>23</sub>, r(pU)<sub>23</sub> и r(pC)<sub>23</sub> соответственно. **Б** – инкубация с препаратом IgG(14) в течение 0,5, 1, 2 ч. Номера препаратов обозначены на рисунке (**В, Г**). Во всех случаях дорожки K1 и K2 соответствуют инкубированным без АТ препаратам РНК до и после их денатурации. М – маркеры длины олигонуклеотидов.



**Рис. 25.** Зависимости эффективности гидролиза miR-137 под действием препарата IgG<sub>mix</sub> больных шизофренией от pH реакционной смеси, присутствия ЭДТА и ионов различных металлов. **А** – зависимость от pH реакционной смеси. **Б** – зависимость от присутствия ЭДТА (10 мМ) и ионов различных металлов (40 мМ).

Известно, что условия реакции значительно влияют на активность канонических РНКаз [410]. Поэтому проведено исследование влияния pH реакционной среды на эффективность гидролиза miR-137 под действием IgG<sub>mix</sub> больных шизофренией. Показано, что оптимальное значение pH в реакции гидролиза miR-137 близко к 7,5 (Рис. 25 А). Также оценено влияние ионов металлов на РНКазную активность (Рис. 25 Б). Максимальная активность IgG<sub>mix</sub> в гидролизе miR-137 наблюдалась в отсутствие дополнительных компонентов, а диализ IgG против 10 мМ ЭДТА приводил к снижению их активности в ~1,7 раза. Ионы Mn<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> понижали активность в ~1,8 раза, а Mg<sup>2+</sup> – только в 1,2 раза (Рис. 25 Б). Интересно, что добавление к диализованному против ЭДТА IgG ионов Mg<sup>2+</sup> или Mn<sup>2+</sup> приводило к более выраженному ингибированию активности примерно в 5,2–9,3 раза, в то время как добавление ионов Zn<sup>2+</sup> снижало активность только в 1,6 раз. Активность канонических РНКаз человека не зависит от ионов металлов [410]. В то же время IgG из крови больных аутоиммунными заболеваниями могут быть как независимыми, так и зависимыми от ионов металлов [223, 418]. В отличие от абзимов пациентов с СКВ и РС, ионы Mg<sup>2+</sup> не активируют, а ингибируют гидролиз микроРНК антителами больных шизофренией. Ингибирование двухвалентными катионами может быть связано с образованием комплексов с остатками His в активном центре, что наблюдается при ингибировании РНКазы А ионами Zn<sup>2+</sup> [410].



**Рис. 26.** Кинетические графики зависимости относительных начальных скоростей гидролиза от концентрации микроРНК в координатах Лайнуивера-Берка для препарата IgG(14). **А, Б, В, Г** – гидролиз miR-137, miR-9-5p, miR-219-a-2-3p и miR-219-5p соответственно. Погрешность определения начальной скорости из трех экспериментов в каждом случае не превышала 7–10%.

Антитело-зависимый катализ обычно характеризуется в  $10^2$ – $10^6$  раз более низкими значениями  $k_{\text{cat}}$  по сравнению с каноническими ферментами [155, 394]. Для препарата IgG(14) больного шизофренией с высокой РНКазной активностью оценены кажущиеся значения  $K_m$  и  $k_{\text{cat}}$  в реакции гидролиза четырех микроРНК. Зависимости начальной скорости от концентрации микроРНК в реакции, катализируемой IgG, соответствовали кинетике Михаэлиса – Ментен. Значения  $K_m$  и  $k_{\text{cat}}$  оказались сопоставимыми для всех микроРНК: miR-137 –  $K_m = 3,5 \pm 0,2$  мкМ,  $k_{\text{cat}} = 0,14 \pm 0,009$  мин<sup>-1</sup>; miR-9-5p –  $K_m = 2,4 \pm 0,13$  мкМ,  $k_{\text{cat}} = 0,083 \pm 0,003$  мин<sup>-1</sup>; miR-219-2-3p –  $K_m = 1,7 \pm 0,12$  мкМ,  $k_{\text{cat}} = 0,10 \pm 0,008$  мин<sup>-1</sup>; miR-219a-5p –  $K_m = 4,5 \pm 0,2$  мкМ,  $k_{\text{cat}} = 0,17 \pm 0,02$  мин<sup>-1</sup>. Полученные кажущиеся значения  $k_{\text{cat}}$  относительно высокие, но примерно на порядок ниже, чем для IgG из крови пациентов с СКВ [221, 222]. Однако поскольку исследовали поликлональные антитела, РНКазные активности отдельных моноклональных субфракций в пуле антител могут быть значительно выше, чем у поликлональных IgG.

**Таблица 7.** Коэффициенты корреляции общих клинических показателей и РНКазной активности IgG пациентов с шизофренией.

Параметры		РНКазная активность IgG			
		miR-137	miR-9-5p	miR-219a-2-3p	miR-219a-5p
Длит. заболевания		-0,187	-0,174	-0,025	-0,073
Возраст		0,203	-0,168	-0,153	-0,236
PANSS +		-0,122	0,024	0,092	0,196
PANSS -		0,114	0,297	0,294	0,292
Композитный индекс		-0,133	-0,333	-0,257	-0,205
PANSS общ.		-0,126	0,427	<b>0,479</b>	<b>0,583</b>
PANSS сумм.		-0,01	0,37	<b>0,449</b>	<b>0,524</b>
РНКазная активность IgG	miR-137	-	0,162	0,108	0,096
	miR-9-5p	0,162	-	<b>0,922</b>	<b>0,871</b>
	miR-219a-2-3p	0,108	<b>0,922</b>	-	<b>0,952</b>
	miR-219a-5p	0,096	<b>0,871</b>	<b>0,952</b>	-

*Примечания.* При корреляционном анализе данных использовали непараметрический критерий Спирмена. Жирным шрифтом выделены статистически значимые коэффициенты корреляции ( $p < 0,05$ ). Выраженность симптомов у больных шизофренией оценивали по «Шкале позитивных и негативных синдромов (PANSS)» [312]. PANSS «+» – шкала позитивных синдромов. PANSS «-» – шкала негативных синдромов. Композитный индекс – разница между баллами по шкале PANSS «+» и PANSS «-». PANSS общ. – общая шкала психопатологии, которая оценивает общие аспекты психопатологии и степень тяжести шизофрении. PANSS сумм. – общее количество баллов по шкале PANSS «+», PANSS «-» и PANSS общ.

Проанализирована корреляция уровня микроРНК-гидролизующей активности с клиническими параметрами заболевания (Таблица 7). Выявлено, что уровни гидролиза различных микроРНК положительно коррелировали между собой ( $r > 0,8$ ), за исключением уровня гидролиза miR-137. Корреляционный анализ с клиническими параметрами показал, что уровень РНКазной активности IgG в реакции гидролиза miR-219-2-3-р и miR-219-5п коррелировал с баллами по шкале общих симптомов PANSS и суммой баллов по шкалам позитивных, негативных и общих симптомов PANSS (Таблица 7) [312]. Кроме того, выявлено, что уровень ДНК-гидролизующей активности IgG пациентов (см. 3.3.2.3) коррелировал с уровнем РНКазной активности IgG при

гидролизе всех микроРНК, за исключением miR-137. Коэффициенты корреляции Спирмена ( $r$ ) составили: 0,475 для miR-9-5p; 0,490 для miR-219-2-3-p и 0,601 для miR-219-5p. Эти данные указывают на то, что при шизофрении образуются каталитические IgG, гидролизующие как ДНК, так и РНК со схожей эффективностью.

РНК, наряду с ДНК, выступает в качестве DAMPs и инициирует воспалительные реакции [419]. Известно, что Toll-подобные рецепторы, такие как TLR3, TLR7 и TLR8 распознают различные формы РНК [419]. Опубликованы данные, что микроРНК (let-7), активирует TLR7, провоцируя воспаление [420]. Лизис клеток вследствие апоптоза или некроза может способствовать высвобождению различных форм РНК (тРНК, рРНК, мРНК, фрагменты коротких РНК и др.) в окружающее пространство [388]. Быстрая деградация таких РНК будет способствовать снижению воспалительных реакций. Поэтому можно предположить, что IgG с РНКазной активностью, наряду с РНКазами крови участвуют в элиминации РНК и минимизации воспаления. Однако РНК-чувствительные TLR7 и TLR8 расположены в эндолизосомах [419]. Также известно, что TLR7 и TLR8 активируются продуктами деградации РНК, которые генерируются эндолизосомальными РНКазой T2 и РНКазой 2 [421]. Известно достаточно доказательств того, что IgG-иммунные комплексы транспортируются через F<sub>c</sub> рецепторы в эндосомы [422, 423, 424]. Поэтому нельзя исключить, что каталитические антитела, гидролизующие РНК, наряду с РНКазой T2 и РНКазой 2, участвуют в активации TLR7 и TLR8.

Хотя микроРНК преимущественно локализованы в клетке, большое количество стабильных микроРНК циркулирует во внеклеточном пространстве [425]. Высвобождение микроРНК из клетки возможно в результате пассивного пути, вызванного апоптозом или некрозом, либо путем активной секреции в виде везикул, экзосом и комплексов с белками или липопротеинами [425]. Полученные в работе данные указывают на существование специфических IgG, узнающих определенные последовательности РНК. Поэтому вполне возможно, что IgG могут вносить вклад в дисрегуляцию микроРНК в крови за счет своей РНКазной активности. Однако, учитывая, что свободная микроРНК (в комплексе с белками) встречается в низкой концентрации в крови, вклад таких IgG может быть незначительным. Тем не менее, известно, что антитела, в том числе с нуклеазной активностью способны проникать в эндосомы и далее в цитозоль клетки за счет взаимодействия с сульфатированными протеогликанами или различными рецепторами и антигенами на поверхности клетки [296–300, 426, 427]. Такие антитела чаще всего направлены против внутриклеточных антигенов (ДНК, гистоны, рибосомный белок Р, ядерные рибонуклеопротеины) и обнаруживаются при аутоиммунных заболеваниях [426]. В некоторых случаях интернализация аутоантител вызывает апоптоз клеток,

высвобождение цитокинов и воспалительные реакции [426]. Антитела с нуклеазной активностью приводят к фрагментации нуклеиновых кислот в клетке, влияя на экспрессию некоторых генов и приводя к апоптозу [296–298]. Поэтому обнаруженные IgG с ДНКазной (см. 3.3.2.3) и РНКазной активностями могут играть важную роль в развитии шизофрении.

Поскольку образование антител к нуклеиновым кислотам происходит при иммунизации ядерными компонентами, в частности гистонами, представлялось интересным изучить способность IgG гидролизовать эти белки.

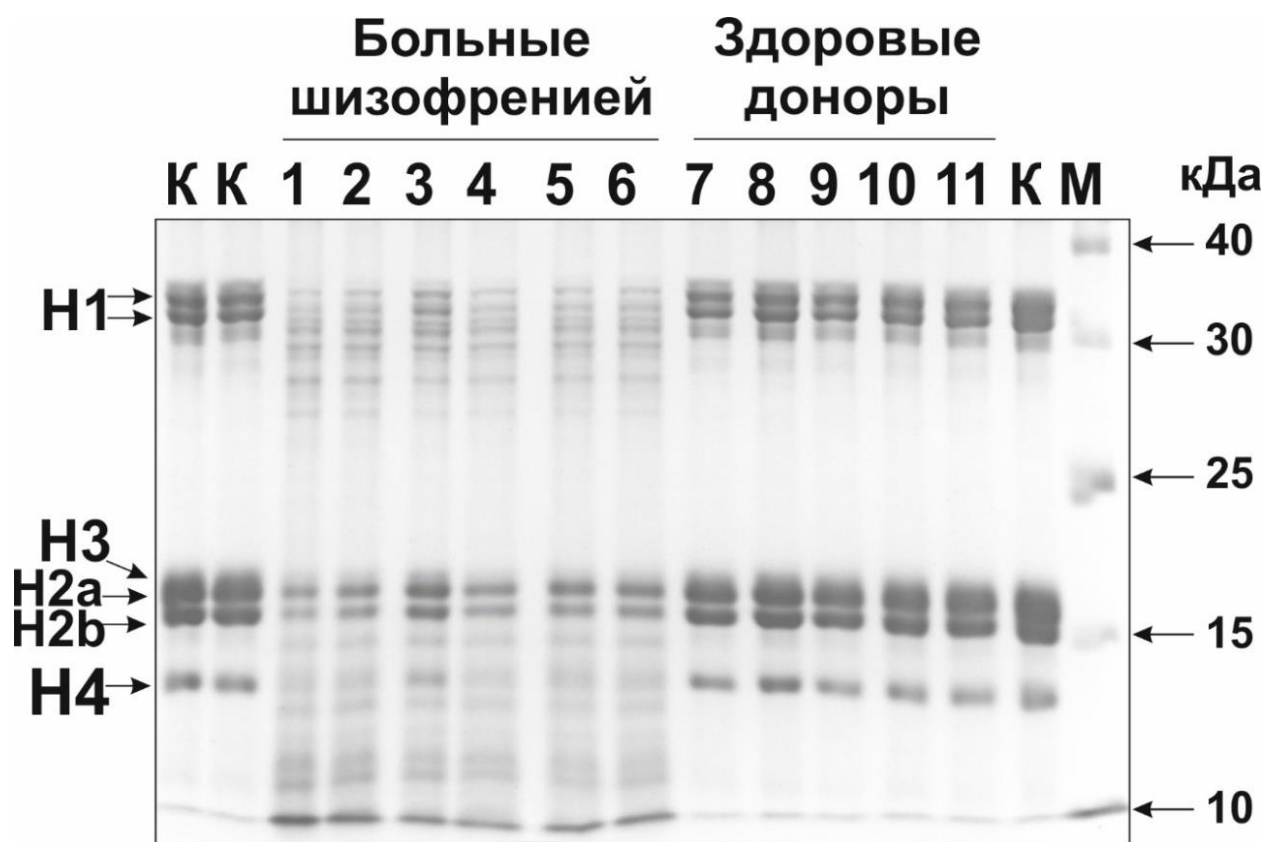
### 3.3.2.6. Гидролиз гистонов антителами больных шизофренией

Гистоны и их посттрансляционные модификации играют ключевую роль в ремоделировании хроматина и транскрипции генов. В дополнение к внутриядерным функциям гистоны действуют как молекулярные фрагменты, связанные с повреждением (DAMPs), вызывая воспалительные реакции и иммунную активацию при высвобождении из клетки [428]. Гистоны и нуклеосомы могут попадать во внеклеточное пространство и в кровотоки в результате апоптоза, пироптоза, некроза и других вариантов запрограммированной гибели клеток [429]. Кроме того, во время некроза нейтрофилы высвобождают внеклеточные ловушки (NETs), содержащие ДНК и гистоны (из ядерного или митохондриального хроматина), которые действуют не только как физический барьер, но также проявляют бактерицидную активность, нейтрализуя различные патогены [430]. Однако при избыточной активности этого процесса концентрация внеклеточных гистонов может значительно возрастать [429]. Как упоминалось выше (см. п. 3.3.2.3), при шизофрении наблюдается нарушение процессов апоптоза, что также может приводить к избыточному поступлению ДНК, нуклеосом и гистонов во внеклеточное пространство и кровотоки [389, 390]. Внеклеточные гистоны при высокой концентрации приводят к активации иммунной системы и системным воспалительным реакциям [429]. Кроме того, свободная ДНК в комплексе с нуклеосомой и гистонами выступает в качестве основного антигена и приводит к образованию аутоантител [428]. Полученные в работе данные (см. Таблицу 7), а также данные других научных групп подтверждают увеличение уровня антител против ДНК [398, 399] и гистонов [431, 432] при шизофрении. Поэтому удаление циркулирующих внеклеточных гистонов и ДНК может снизить воспалительные и аутоиммунные реакции.

Антинуклеарные антитела, в том числе против ДНК, образуются при иммунизации комплексами гистонов с ДНК, нуклеосомами или непосредственно гистонами [433, 434]. Учитывая приведенные выше данные о ДНК- и РНК-гидролизующей активности IgG при

шизофрении (см. п. 3.3.2.3 – 3.3.2.5), в данной работе изучена способность антител гидролизовать различные гистоны.

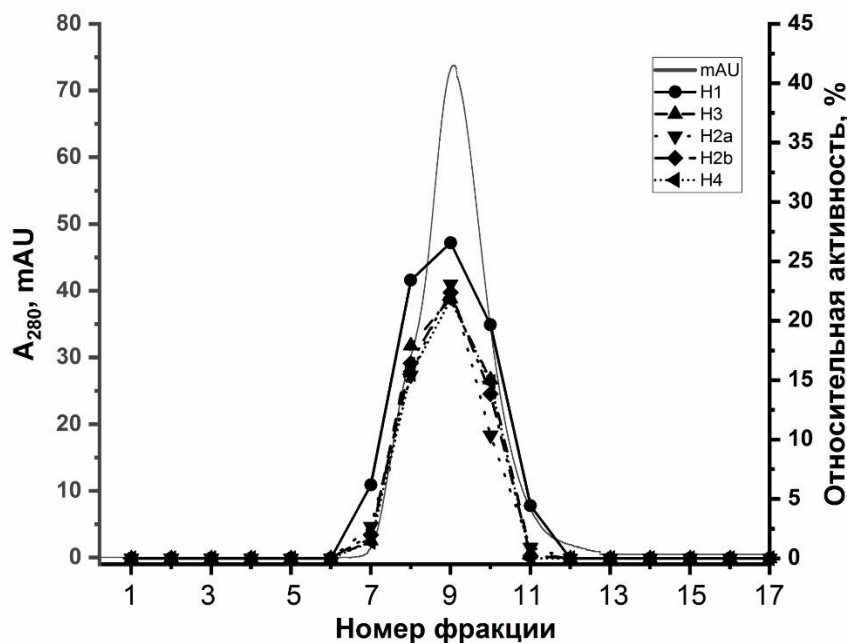
Анализ гистон-гидролирующей активности IgG, выделенных ранее (см. п. 3.1), проводили с помощью SDS-PAGE. В результате проведенной работы показано, что инкубация смеси гистонов (H1, H2a, H2b, H3 и H4) с препаратами IgG пациентов с шизофренией приводила к снижению интенсивности окрашенных Coomassie R-250 полос исходных гистонов на геле и появлению их различных фрагментов с более низкой молекулярной массой (Рис. 27). Препараты IgG здоровых доноров не продемонстрировали видимого гидролиза гистонов.



**Рис. 27.** SDS-PAGE анализ гистон-гидролизующей активности препаратов IgG больных шизофренией и здоровых доноров при гидролизе гистонов H1, H2a, H2b, H3, H4. Реакционные смеси инкубировали в течение 20 ч при 37°C в присутствии 46–89 мкМ гистонов и 0,67 мМ IgG. Дорожки 1-6 – IgG больных шизофренией; дорожки 7-11 – IgG здоровых доноров; дорожка К – контрольная реакционная смесь без IgG; дорожка М – маркеры молекулярной массы белков.

Для того, чтобы доказать что гистон-гидролизующая активность принадлежит непосредственно IgG, проводили гель-фильтрацию смеси препаратов IgG пациентов (IgG<sub>mix</sub>) на колонке Superdex 200 в диссоциирующих условиях, затем определяли активность в полученных фракциях, аналогично другим работам [254, 255, 256, 435]. При гель-фильтрации происходит разрушение и разделение нековалентных белковых

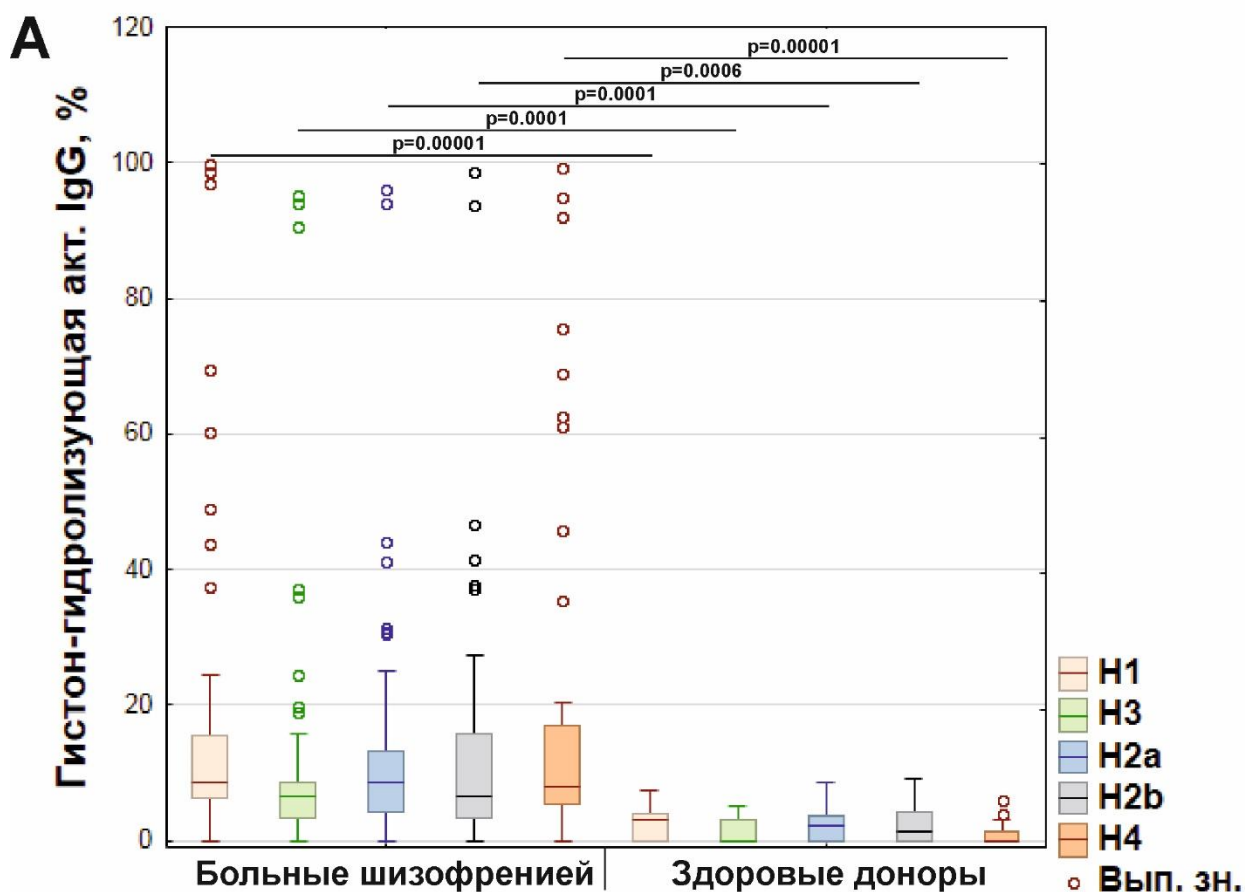
комплексов. Совпадение профилей гель-фильтрации ( $A_{280}$ ) и профилей протеолитической активности  $IgG_{mix}$  при гидролизе пяти гистонов и отсутствие каких-либо других пиков (Рис. 28) обеспечивает надежное доказательство того, что  $IgG$  обладают гистон-гидролизующей активностью и не содержат никаких примесей других протеаз.



**Рис. 28.** Профиль гель-фильтрации  $IgG_{mix}$  пациентов на Superdex 200 в условиях диссоциации нековалентных комплексов (10 mM Gly-HCl, pH 2,6) и относительная активность (%) полученных фракций в гидролизе гистонов: (-) – поглощение при 280 нм ( $A_{280}$ ); обозначение гидролизуемых гистонов показано на рисунке. Полный гидролиз каждого из пяти гистонов в течение 20 ч в присутствии 5 мкл каждой фракции элюата принимали за 100%.

Далее провели анализ активности на бóльших группах больных и здоровых доноров. Для скрининга использованы 50 препаратов  $IgG$  больных шизофренией и 25 препаратов  $IgG$  здоровых доноров, выделенных на предыдущих этапах (см. п. 3.1). Согласно результатам скрининга, уровень гистон-гидролизующей активности  $IgG$  варьировал в широких пределах (Рис. 29 А). Уровень относительной протеолитической активности  $IgG$  определяли по уменьшению интенсивности полос белка каждого гистона в результате гидролиза (полный гидролиз субстрата принят за 100%). Интересно, что уровень гидролиза всех пяти гистонов антителами пациентов с шизофренией был статистически значимо ( $p < 0,0006$ ) в 6,1–20,2 раза выше, чем  $IgG$  здоровых людей (Рис. 29 А). В зависимости от гистона различия были следующими (кратно): Н1 (7,3), Н2а (8,2), Н2б (6,5), Н3 (6,1) и Н4 (20,2).





**Рис. 29.** Сравнительный анализ гистон-гидролизующей активности IgG больных шизофренией и здоровых людей. **А** – уровень гистон-гидролизующей активности IgG нормированной на стандартные условия (46–89 мкМ гистонов, в зависимости от гистона; 0,67 мМ IgG; 20 ч инкубации при 37°C). Полный гидролиз гистонов принят за 100%. Выпадающие значения помечены светлыми кружками. Достоверность различий ( $p$ ), рассчитанная с помощью U-критерия Манна-Уитни, указана на рисунке. **Б** – круговые диаграммы, показывающие количество и относительный процент препаратов IgG, гидролизующих и не гидролизующих гистоны у больных шизофренией и здоровых доноров.

Необходимо отметить, что активность препаратов IgG пациентов неоднородна (Рис. 29). Например, среди 50-ти проанализированных IgG больных шизофренией 34 препарата (68%) гидролизovali все пять гистонов, 14 антител (28%) расщепляли от 1 до 4 гистонов, и только два IgG (4%) не гидролизovali ни один гистон (Рис. 29 **Б**). В то же время среди всех препаратов IgG пациентов десять препаратов (20%) обладали высоким

уровнем активности (гидролиз субстрата > 20%) в отношении гидролиза всех пяти гистонов, из которых семь препаратов IgG пациентов продемонстрировали наибольшую активность (>40% гидролиза субстрата). Таким образом, около 20 % больных обладали более выраженной активностью, в отличие от остальных больных. Эти данные указывают на то, что примерно 20% пациентов с шизофренией имеют более выраженные иммунологические нарушения. Следует отметить, что полученные данные согласуются с литературными данными о том, что у 23% пациентов с шизофренией детектируются IgG против гистонов, в то время как только у 6,6% здоровых детектируются такие антитела [431]. Таким образом, полученные данные могут быть использованы для выявления пациентов с выраженными нарушениями гуморального иммунитета.

В отличие от пациентов, среди 16-ти исследованных препаратов IgG здоровых доноров только три препарата (19%) гидролизовали с низкой интенсивностью (<9% гидролиза субстрата) все пять гистонов, девять образцов антител (56%) слабо расщепляли 1–4 гистона и четыре препарата (25%) не гидролизовали ни одного гистона (Рис. 29 Б). Однако следует подчеркнуть, что IgG здоровых доноров имели более низкий уровень активности, чем IgG пациентов с шизофренией. Медианные значения относительной активности (%) составили: Н1–4,3; Н2а–0; Н2б–2,1; Н3–2,3; Н4–0 (средние и медианные значения активности пациентов представлены в Приложении в Таблице П 1).

Анализ относительной протеолитической активности IgG пациентов в зависимости от преобладающей симптоматики показал, что, несмотря на то, что средние значения гистон-гидролизующей активности IgG у пациентов с шизофренией с ведущими негативными симптомами в 1,2–1,9 раза выше, чем у пациентов с ведущими позитивными симптомами (Таблица П 1 Приложения), тем не менее эти различия оказались статистически незначимыми (во всех случаях  $p > 0,05$ ). Кроме того, средние значения уровней гидролиза всех пяти гистонов (Н1–Н4) препаратами IgG в общей группе пациентов незначительно отличались от средних значений в группах пациентов с различной симптоматикой, а медианы значений во всех анализируемых группах оказались сопоставимыми.

Также проанализированы уровни гистон-гидролизующей активности IgG пациентов в зависимости от типа шизофрении в соответствии с Международной классификацией болезней (МКБ-10) (Таблица П 2 Приложения). Хотя средние значения протеолитической активности IgG у пациентов с различными типами шизофрении различались в некоторых случаях более чем в два раза, тем не менее медианные значения уровней активности IgG сопоставимы. Используя односторонний дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса,

значимых различий между уровнями гистон-гидролизующей активности IgG у разных пациентов в зависимости от типа шизофрении не обнаружено ( $p > 0,05$ ).

**Таблица 8.** Коэффициенты корреляции общих клинических показателей и гистон-гидролизующей активности IgG больных шизофренией.

Параметры		Гистон-гидролизующая активность IgG <sup>1</sup>				
		H1	H3	H2a	H2b	H4
Клинические данные	Длительность заболевания	-0,031	-0,016	0,024	0,035	-0,037
	Возраст	-0,116	0,073	-0,077	-0,094	-0,111
	PANSS «+» <sup>2</sup>	0,008	0,086	0,130	0,078	0,085
	PANSS «-» <sup>2</sup>	0,113	-0,084	0,136	0,178	0,190
	Композитный индекс <sup>2</sup>	-0,077	0,208	0,002	-0,009	-0,060
	PANSS общ. <sup>2</sup>	0,248	0,136	0,264	<b>0,288</b>	<b>0,314</b>
	PANSS сумм. <sup>2</sup>	0,115	0,023	0,195	0,177	0,191
Гистон-гидролизующая активность IgG	H1	-	<b>0,728</b>	<b>0,847</b>	<b>0,667</b>	<b>0,839</b>
	H3	<b>0,728</b>	-	<b>0,670</b>	<b>0,624</b>	<b>0,703</b>
	H2a	<b>0,847</b>	<b>0,670</b>	-	<b>0,801</b>	<b>0,813</b>
	H2b	<b>0,667</b>	<b>0,624</b>	<b>0,801</b>	-	<b>0,697</b>
	H4	<b>0,839</b>	<b>0,703</b>	<b>0,813</b>	<b>0,697</b>	-

<sup>1</sup>Коэффициенты корреляции ( $r$ ) получены с использованием непараметрического критерия Спирмена. Жирным шрифтом выделены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) коэффициенты корреляции.

<sup>2</sup>Выраженность симптомов у больных шизофренией оценивали по «Шкале позитивных и негативных синдромов (PANSS)» [312]. PANSS «+» – шкала позитивных синдромов. PANSS «-» – шкала негативных синдромов. Композитный индекс – разница между баллами по шкале PANSS «+» и PANSS «-». PANSS общ. – общая шкала психопатологии, которая оценивает общие аспекты психопатологии и степень тяжести шизофрении. PANSS сумм. – общее количество баллов по шкале PANSS «+», PANSS «-» и PANSS общ.

Корреляционный анализ (Таблица 8) показал, что уровни гидролиза различных гистонов (H1 – H4) IgG больных шизофренией положительно коррелировали друг с другом (коэффициенты корреляции  $r > 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Таким образом, IgG больных шизофренией гидролизуют различные гистоны с сопоставимой эффективностью.

Статистически значимой корреляции между уровнями протеолитической активности IgG ни с длительностью заболевания, ни с возрастом пациентов не выявлено (Таблица 8). Однако важно отметить, что обнаружена положительная корреляция между относительной активностью IgG в гидролизе гистона H2b и H4 с баллами по подшкале

общих симптомов шкалы PANSS ( $r = 0,288$  и  $r = 0,314$ ,  $p < 0,05$  соответственно) [312]. Других корреляций с клиническими данными пациентов, в том числе с подшкалами, оценивающими превалирующую симптоматику, не выявлено (Таблица 8). Эти данные косвенно согласуются с данными об отсутствии значимых различий между уровнями гистон-гидролизующей активности IgG у пациентов с позитивными и негативными симптомами (Таблица П 1 Приложения).

Нуклеазная активность препаратов IgG пациентов, используемых для анализа гистон-гидролизующей активности, изучена ранее (см. п. 3.3.2.3–3.3.2.5). Это дало возможность провести ретроспективный корреляционный анализ ДНК- и гистон-гидролизующих активностей (Таблица 9). Значимая положительная корреляция обнаружена между относительной активностью IgG в гидролизе гистонов H1, H2a и H4 с ДНКазной активностью IgG ( $r > 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Кроме того, уровень гидролиза гистонов H1 и H4 положительно коррелировал с уровнем РНКазной активности IgG при гидролизе miR-219a-5p и miR-219a-2-3p ( $r > 0,4$ ;  $p < 0,05$ ). Однако других корреляций не выявлено.

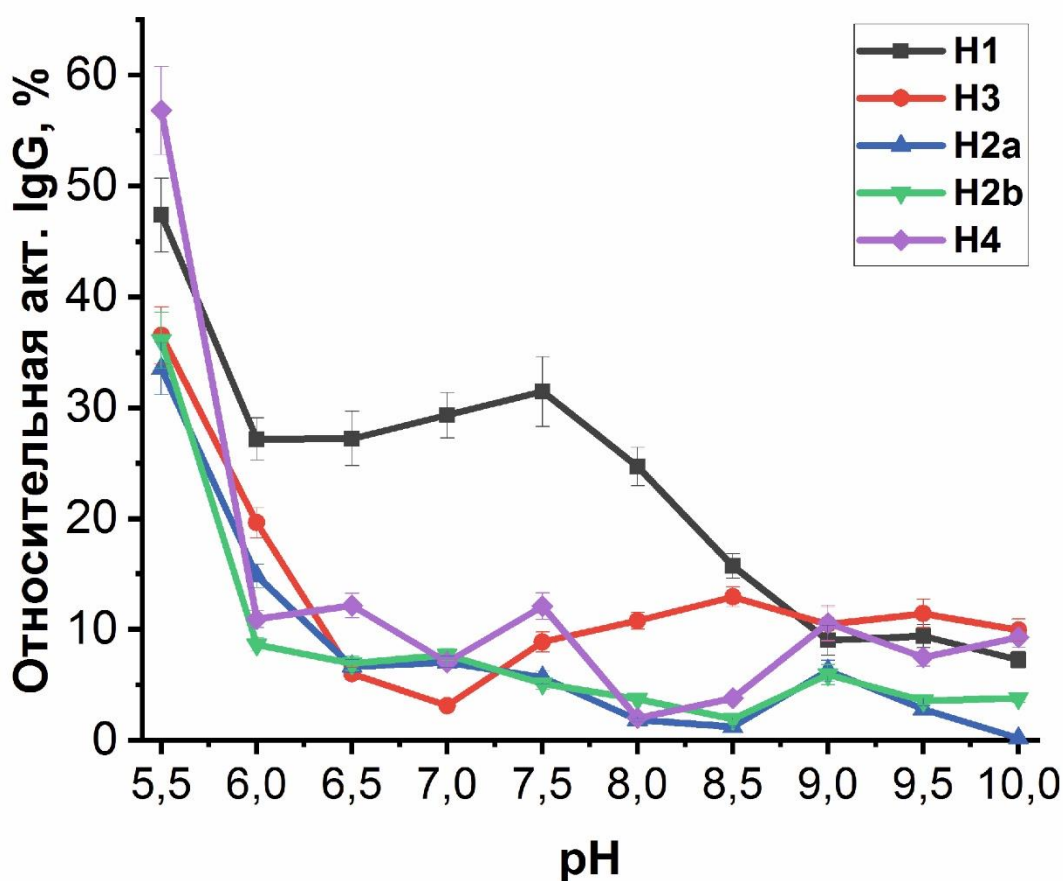
**Таблица 9.** Ретроспективный корреляционный анализ гистон-гидролизующей и нуклеазных активностей IgG больных шизофренией.

Параметры	Гистон-гидролизующая активность IgG*				
	H1	H3	H2a	H2b	H4
ДНКазная активность IgG	<b>0,467</b>	-0,002	<b>0,478</b>	0,256	<b>0,558</b>
РНКазная активность IgG в реакции гидролиза miR-219a-5p	<b>0,542</b>	0,120	0,273	0,221	<b>0,506</b>
РНКазная активность IgG в реакции гидролиза miR-219a-2-3p	<b>0,474</b>	0,089	0,214	0,190	<b>0,453</b>
РНКазная активность IgG в реакции гидролиза miR-9-5p	0,377	0,058	0,088	0,110	0,367
РНКазная активность IgG в реакции гидролиза miR-137	-0,352	-0,161	-0,303	-0,293	-0,217

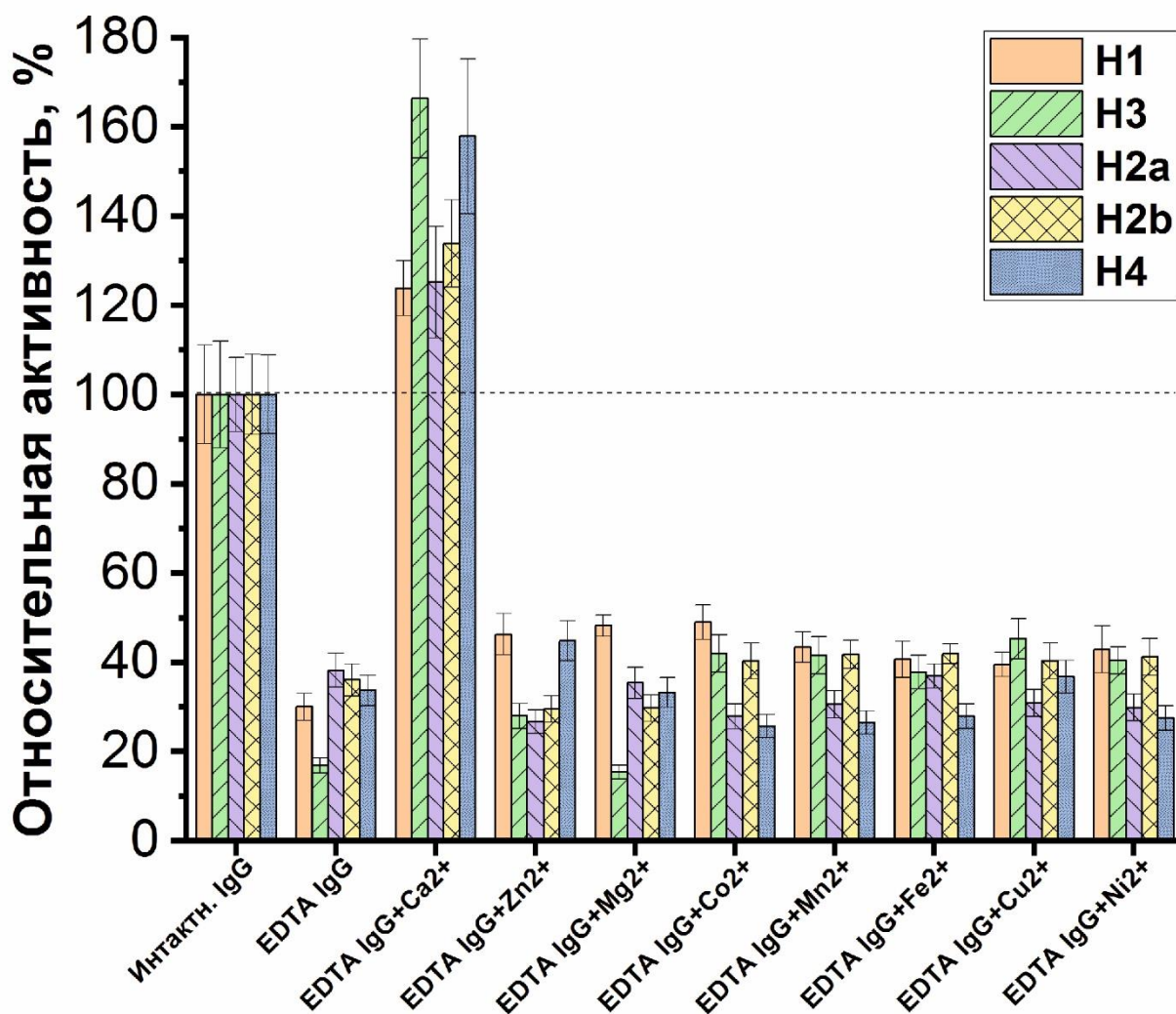
\*Коэффициенты корреляции ( $r$ ) получены с использованием непараметрического критерия Спирмена. Жирным шрифтом выделены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) коэффициенты корреляции.

Далее исследованы каталитические свойства IgG, гидролизующих гистоны, при шизофрении. Анализ зависимости уровня гистон-гидролизующей активности эквимольной смеси девяти высокоактивных препаратов IgG пациентов (IgG<sub>mix</sub>) от величины pH реакционной среды (Рис. 30) показал, что антитела пациентов эффективно гидролизуют все пять гистонов во всем диапазоне pH, но самая высокая

протеолитическая активность наблюдалась при рН 5,5. Кроме того, для гистона Н1 наблюдается выраженное увеличение активности IgG при рН 7,5. Важно отметить, что эффективность гидролиза под действием IgG<sub>mix</sub> разных гистонов в зависимости от рН среды сильно варьирует. Например, гидролиз гистонов Н2а и Н2b при рН 8,5 является самым низким, в то время как гидролиз гистонов Н1 и Н3 намного выше при том же значении рН. Таким образом, каталитические свойства гистон-гидролизующих IgG при шизофрении значительно отличаются от канонических сывороточных протеаз. Результаты о наиболее высокой активности при рН 5,5 оказались неожиданными. Эти данные указывают на то, что часть исследованных каталитических IgG проявляет тип катализа, характерный для кислых протеаз, например катепсинов – внутриклеточных цистеиновых протеаз, для которых оптимум рН находится в диапазоне рН 4–6,8 [436]. Известно, что в области воспаления регистрируются кислые значения рН. Следовательно, возможно, что природные каталитические IgG с «кислым» оптимумом рН участвуют в разрушении гистонов, которые высвобождаются из гибнущих клеток в областях воспаления, тем самым уменьшая воспалительные реакции.



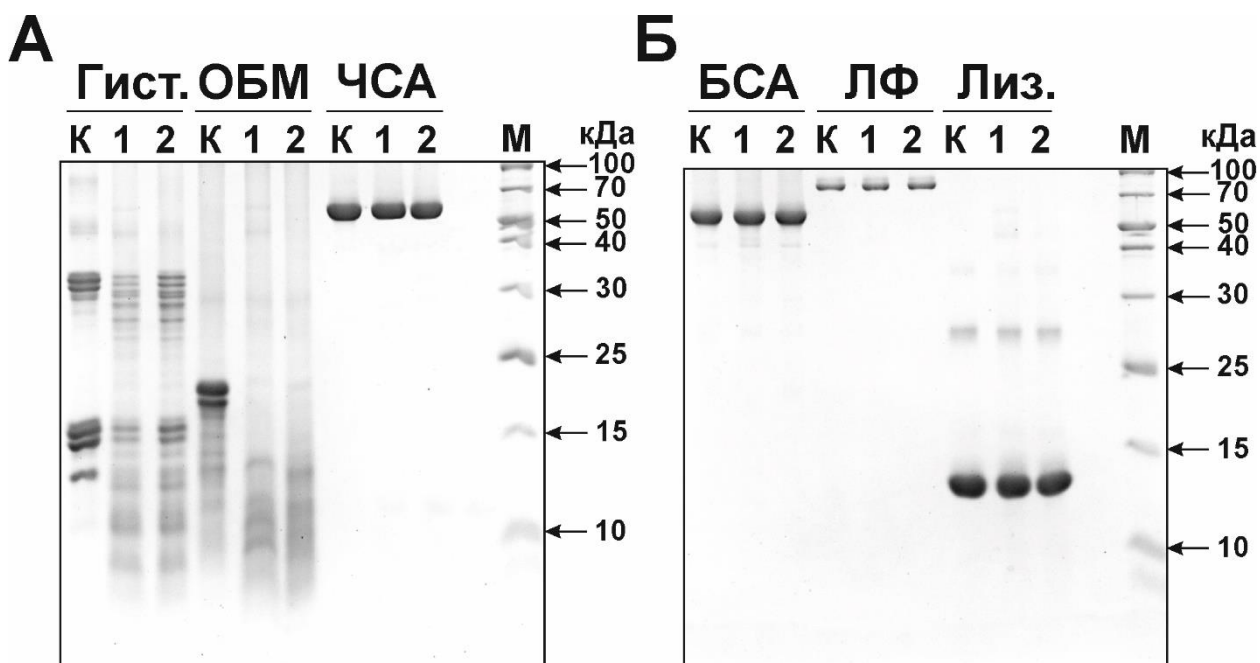
**Рис. 30.** Зависимость относительной протеолитической активности IgG<sub>mix</sub> от величины рН реакционной смеси при гидролизе пяти гистонов. Относительная протеолитическая активность антител при полном гидролизе каждого из пяти гистонов после 20 ч инкубации с 0,67 мкМ IgG<sub>mix</sub>, принята за 100%.



**Рис. 31.** Влияние диализа смеси препаратов пациентов IgG<sub>mix</sub> против ЭДТА и добавления различных ионов металлов (2 мМ) к реакционным смесям на относительный уровень активности при гидролизе пяти гистонов. Используемые ионы металлов показаны на рисунке. Уровень гидролиза гистонов интактными препаратами IgG<sub>mix</sub> (до диализа) принят за 100%.

Анализ зависимости гистон-гидролизующей активности смеси препаратов IgG<sub>mix</sub> от присутствия ионов металлов показал, что диализ против буфера, содержащего ЭДТА, приводит к ингибированию гидролиза всех пяти гистонов более чем на 60% (Рис. 31). Добавление ионов Ca<sup>2+</sup> приводило к значительному увеличению каталитической активности IgG при гидролизе всех гистонов смесью диализованных IgG. Более того, эта активность превышала уровень активности интактных антител. Ионы других металлов незначительно влияли на активность, и эффект зависел от гидролизующего гистона. В одних случаях ионы металлов проявляли ингибирующий эффект, в других – слегка активирующий. Однако наиболее выраженный активирующий эффект продемонстрировали ионы Ca<sup>2+</sup> (Рис. 31). Важно отметить, что аналогичный активирующий эффект ионов Ca<sup>2+</sup> обнаружен при гидролизе ОБМ препаратами IgG пациентов с шизофренией [293], что позволяет предположить, что образование Ca<sup>2+</sup>-

зависимых протеолитических антител – это характерная особенность репертуара антител при шизофрении. Активирующий эффект ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на протеолитическую активность обнаружен также для препаратов IgG ВИЧ-инфицированных пациентов [437]. В случае препаратов IgG больных РС, гидролиз гистонов лучше активировался ионами  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  [435].



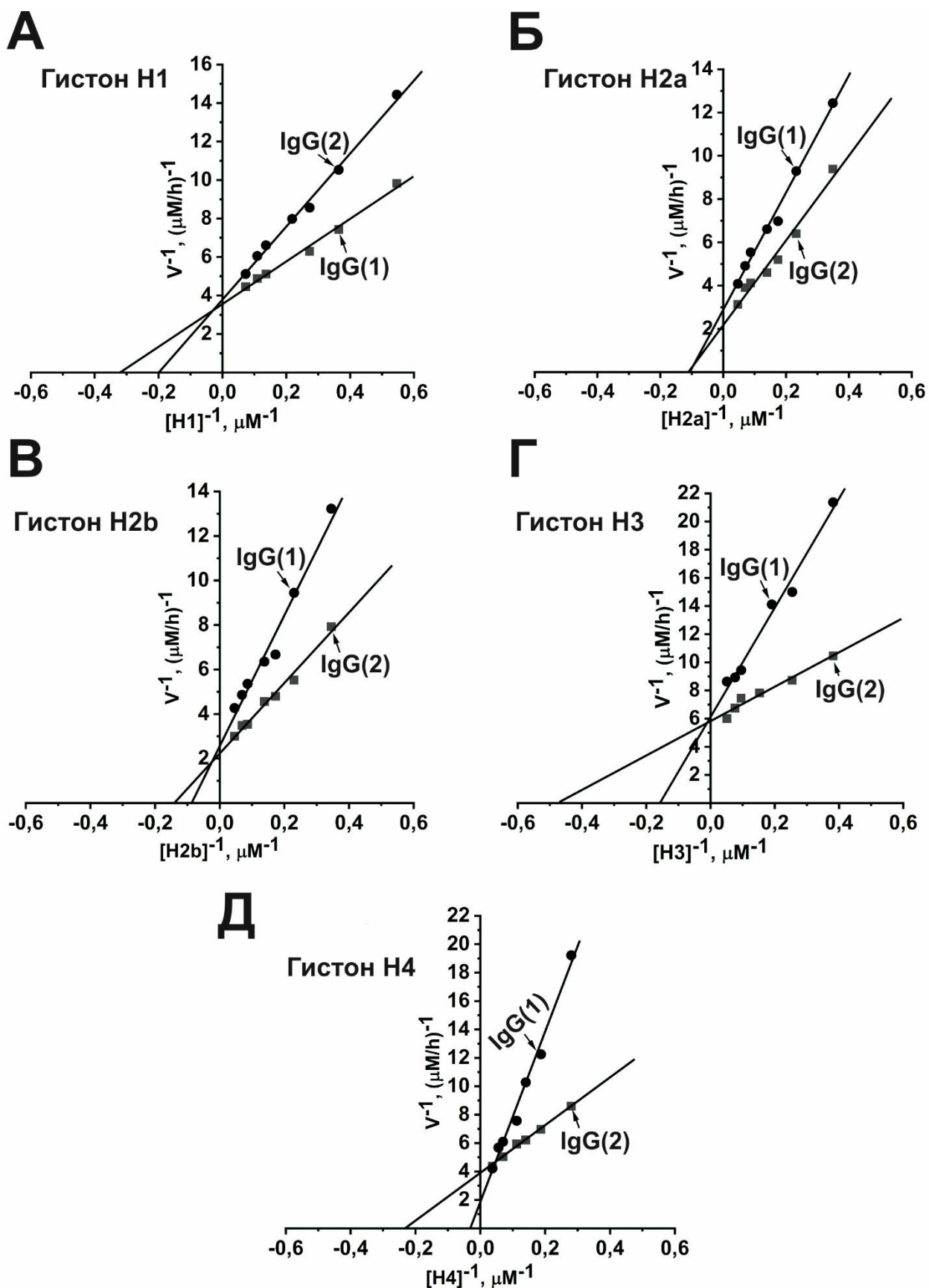
**Рис. 32.** SDS-PAGE-анализ субстратной специфичности двух различных препаратов IgG-1 и IgG-2 (дорожки 1 и 2 соответственно) пациентов с шизофренией при гидролизе различных белков: **А** – эквимольной смеси пяти гистонов (Гист.), основного белка миелина (ОБМ), человеческого сывороточного альбумина (ЧСА); **Б** – бычьего сывороточного альбумина (БСА), лактоферрина грудного молока человека (ЛФ) и лизоцима человека (Лиз.). Во всех случаях дорожка К – различные белки, инкубированные в отсутствие IgG, а дорожка М – маркеры молекулярной массы белков.

Анализ субстратной специфичности показал, что IgG двух разных пациентов с шизофренией эффективно гидролизовали пять гистонов и ОБМ, но не гидролизовали другие контрольные белки (человеческий и бычий сывороточный альбумин, лактоферрин грудного молока, человеческий лизоцим) в тех же условиях реакции (Рис. 32 **А**, **Б**). Гидролиз ОБМ антителами больных шизофренией показан ранее в другой работе [293]. Результаты данного исследования подтверждают эти данные. Важно отметить, что проанализированные в этой работе препараты поликлональных IgG не подвергались аффинной хроматографии на гистон-сефарозе и ОБМ-сефарозе для получения специфических IgG против этих белков. Поэтому, следует предположить, что гистоны гидролизуются в основном антигистоновыми антителами, а ОБМ – анти-ОБМ антителами. Однако сравнительно недавно при СКВ и ВИЧ-инфекции открыто явление каталитической кросс-реактивности [225, 438], при которой антитела против гистонов

гидролизуют ОБМ и наоборот. Поэтому нельзя исключить, что при шизофрении также образуются антитела с перекрестной каталитической реактивностью, способные гидролизовать как гистоны, так и ОБМ.

Каталитические антитела могут связывать антиген с различной аффинностью, которая определяет скорость катализа. Для оценки кинетических параметров гидролиза гистонов под влиянием IgG использовали подход Михаэлиса-Ментен и координаты Лайнуивера-Берка. Зависимости скорости гидролиза гистонов от их концентрации для двух препаратов IgG подтвердили соответствие кинетике Михаэлиса-Ментен (Рис. 33). У пациентов, из сыворотки которых получены эти препараты IgG, оказались схожие клинические данные. Они различались только полом, длительностью заболевания, типом течения шизофрении: IgG(1) (пол – мужской, длительность заболевания – 9 лет, F20.01 – параноидная шизофрения, эпизодическое течение с нарастающим дефектом) и IgG(2) (пол – женский, F20.00 – параноидная шизофрения с непрерывным течением). IgG этих пациентов продемонстрировали сопоставимую протеолитическую активность. Однако эти два препарата IgG демонстрируют разные кинетические параметры. Кажущиеся значения  $K_m$  пяти гистонов для препаратов IgG(1) и IgG(2) варьировали от 2,3 до 24,1 мкМ, а  $k_{cat}$  – от  $3,9 \times 10^3$  до  $11,1 \times 10^3$  мин<sup>-1</sup> (Таблица 10). Наибольшее сродство наблюдалось у препарата IgG(1) к гистонам Н3 и Н1:  $K_m = 2,3$  и  $2,8$  мкМ соответственно. Наименьшее сродство показал препарат IgG(2) к Н2а ( $K_m = 8,9$  мкМ) и Н4 ( $K_m = 24,1$  мкМ) (Таблица 10). Таким образом, при шизофрении могут продуцироваться абзимы против пяти гистонов с очень разной аффинностью и каталитической активностью. Эти данные подтверждают гетерогенность исследуемых препаратов IgG. Полученные значения  $K_m$  для гистона Н1 (2,8–4,8 мкМ) сравнимы с таковыми для IgG пациентов с РС (4,0–6,7 мкМ) [435] и для IgG ВИЧ-инфицированных пациентов (1,0–5,6 мкМ) [437], что указывает на сопоставимое сродство к гистонам IgG больных шизофренией и пациентов с ВИЧ-инфекцией и РС. Исходя из полученных данных следует, что IgG больных шизофренией обладают более высоким сродством, чем канонические протеазы. Однако следует отметить, что патогенные антиген-специфические аутоантитела обычно обладают высокой аффинностью (диапазон  $K_d$ :  $10^{-6}$ – $10^{-10}$  М) [439]. Следовательно, некоторые антитела при шизофрении обладают каталитической активностью и довольно высокой скоростью катализа вследствие их более низкого сродства, чем у высокоаффинных антиген-специфических аутоантител.





**Рис. 33.** Зависимости начальных скоростей гидролиза пяти гистонов (А – Н1, Б – Н2а, В – Н2b, Г – Н3, Д – Н4) от их концентрации в координатах Лайнуивера – Берка для двух индивидуальных препаратов IgG(1) и IgG(2) больных шизофренией. Погрешность оценки начальной скорости при каждой концентрации субстрата не превышала 10–25%.

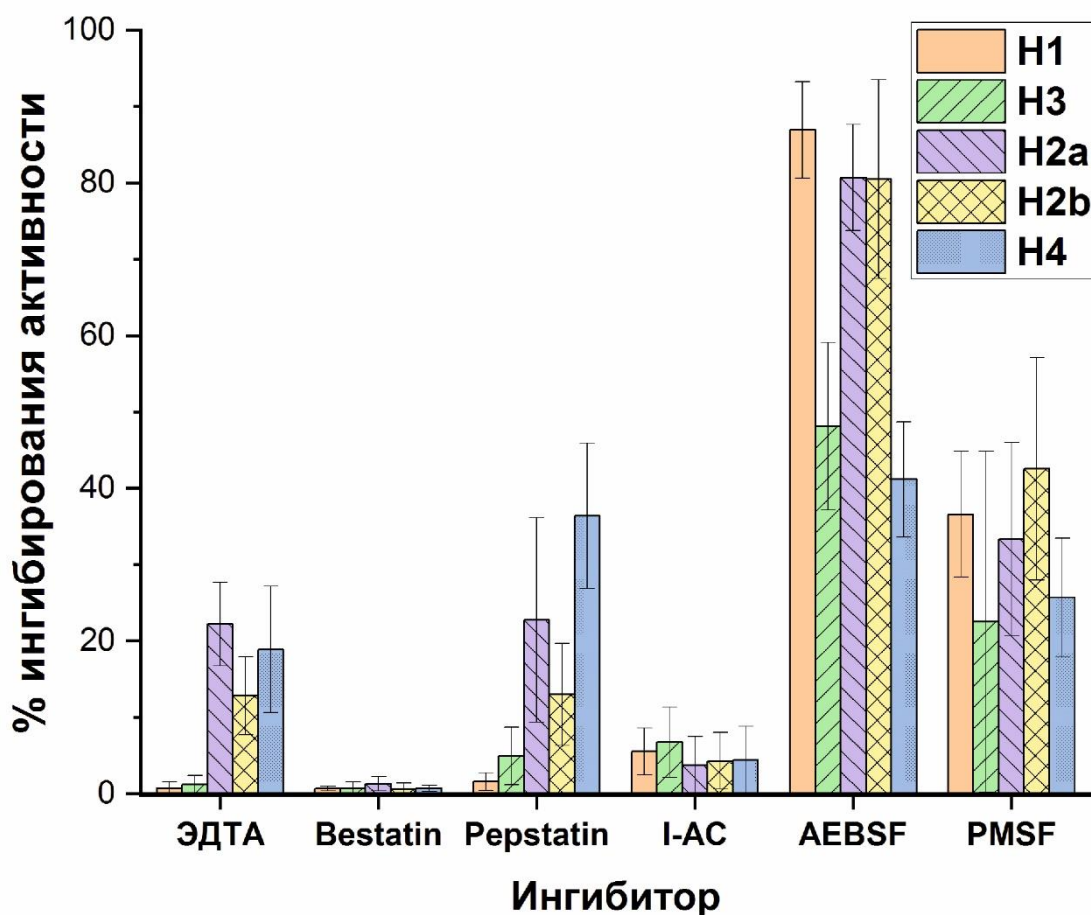
**Таблица 10.** Величины  $K_m$  и  $k_{cat}$ , характеризующие эффективность гидролиза гистонов двумя индивидуальными препаратами IgG больных параноидной шизофренией.

Гистоны (субстраты)	Кинетические параметры	IgG(1)*	IgG(2)*
Н1	$K_m, \mu\text{M}$	$2,8 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,2$
	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$(6,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(6,5 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
Н2а	$K_m, \mu\text{M}$	$7,1 \pm 1,1$	$8,9 \pm 1,0$
	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$(10,2 \pm 0,7) \times 10^{-3}$	$(8,4 \pm 0,4) \times 10^{-3}$
Н2б	$K_m, \mu\text{M}$	$6,4 \pm 0,6$	$8,0 \pm 1,1$
	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$(10,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$(8,0 \pm 0,5) \times 10^{-3}$
Н3	$K_m, \mu\text{M}$	$2,3 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,8$
	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^{-3}$
Н4	$K_m, \mu\text{M}$	$4,7 \pm 0,3$	$24,1 \pm 4,2$
	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$(6,6 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(11,1 \pm 1,2) \times 10^{-3}$

\*Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD). В каждом случае проведено не менее трех измерений. Погрешность измерения приведенных значений не превышала 10–25%.

Для выяснения типа протеолитической активности препаратов IgG проведен ингибиторный анализ с использованием различных специфических ингибиторов протеаз (полное название и характеристики указаны в Таблице 4). Ингибиторы оказывали схожий эффект на все четыре проанализированных индивидуальных препарата IgG. Наиболее выраженный эффект в IgG-зависимой реакции гидролиза гистонов оказали ингибиторы AEBSF и PMSF (Рис. 34), которые ингибируют протеазы серинового типа [435]. Поэтому основная часть гистон-гидролизующих IgG проявляет свойства сериновых протеаз. Небольшое влияние оказал pepstatin A, ингибирующий кислые протеазы [435], меньший эффект оказал ингибитор металл-зависимых ферментов – ЭДТА. Ингибитор тиоловых протеаз (I-AC) также проявлял небольшой эффект. Практически никакого эффекта не оказывал ингибитор bestatin, который ингибирует экзопептидазы, в том числе лейцинаминопептидазу и аминопептидазу В. Важно отметить, что наблюдались различия в ингибирующем эффектах реагентов в реакциях гидролиза различных гистонов. Например, pepstatin A ингибировал гидролиз гистона Н4 примерно на 40%, в то время как

этот же ингибитор практически не ингибировал гидролиз гистонв Н1 (Рис. 34). Таким образом, антитела, гидролизующие гистоны при шизофрении представляют собой смесь абзимов с различным типом протеолитической активности (сериновых, кислых, металлопротеаз, тиоловых), причем для каждого гистона нарабатывается индивидуальный пул абзимов с различным соотношением типов протеолитической активности. Похожие данные получены при ингибиторном анализе протеолитических IgG при шизофрении (при гидролизе ОБМ) [293] и других заболеваниях [435, 437].



**Рис. 34.** Ингибиторный анализ гистон-гидролизующей активности IgG больных шизофренией. За 100% принято полное отсутствие гидролиза соответствующего гистона. Используемые ингибиторы указаны на рисунке. Характеристики и полное название ингибиторов приведены в Таблице 4.

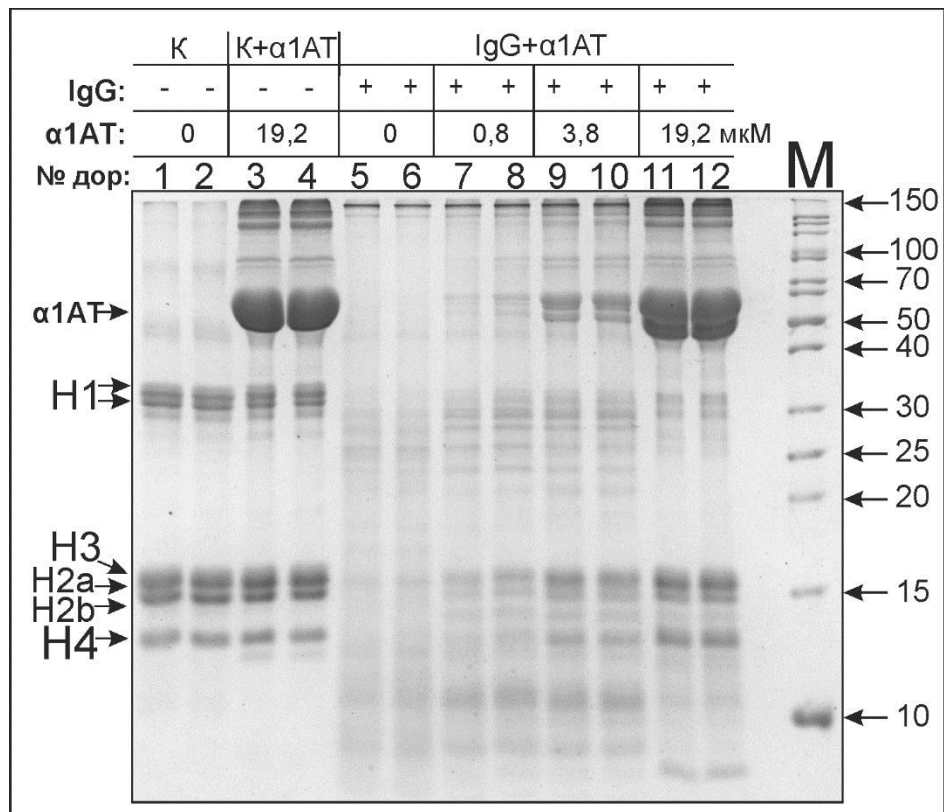
Первым примером IgG с протеолитической активностью при шизофрении считаются ОБМ-гидролизующие антитела [293]. В данной работе обнаружен новый пример абзимов-протеаз – гистон-гидролизующие антитела. В целом, исследованные биохимические свойства (зависимость от pH и ионов металлов, кинетические характеристики) гистон-гидролизующих IgG при шизофрении, как и при других заболеваниях, заметно отличались от канонических протеаз. Можно предположить, что IgG, гидролизующие гистоны, могут играть как положительную, так и отрицательную роль в развитии шизофрении.

Положительная роль может быть связана с разрушением и удалением гистонов из кровотока или участков воспаления. Поскольку внеклеточные гистоны вызывают воспалительные и аутоиммунные реакции [428, 429], удаление гистонов может уменьшить эти реакции. Однако отрицательная роль гистон-гидролизующих IgG при шизофрении может быть связана с каталитической перекрестной реактивностью антигистоновых IgG к ОБМ, аналогичной таковой для антител у пациентов с СКВ и ВИЧ [225, 438]. Нельзя исключить, что такая каталитическая перекрестная реактивность IgG может способствовать разрушению миелиновой оболочки нервных волокон и гипомиелинизации, наблюдаемой при шизофрении [114]. Известно, что шизофрения связана с хроническим вялотекущим воспалением [129, 130, 131]. Следовательно, антитела, гидролизующие гистоны, могут рассматриваться как новое звено между гуморальным иммунитетом и воспалительными реакциями при шизофрении.

### 3.3.2.7. Ингибирование протеолитической активности IgG $\alpha$ 1-антитрипсином и апротинином

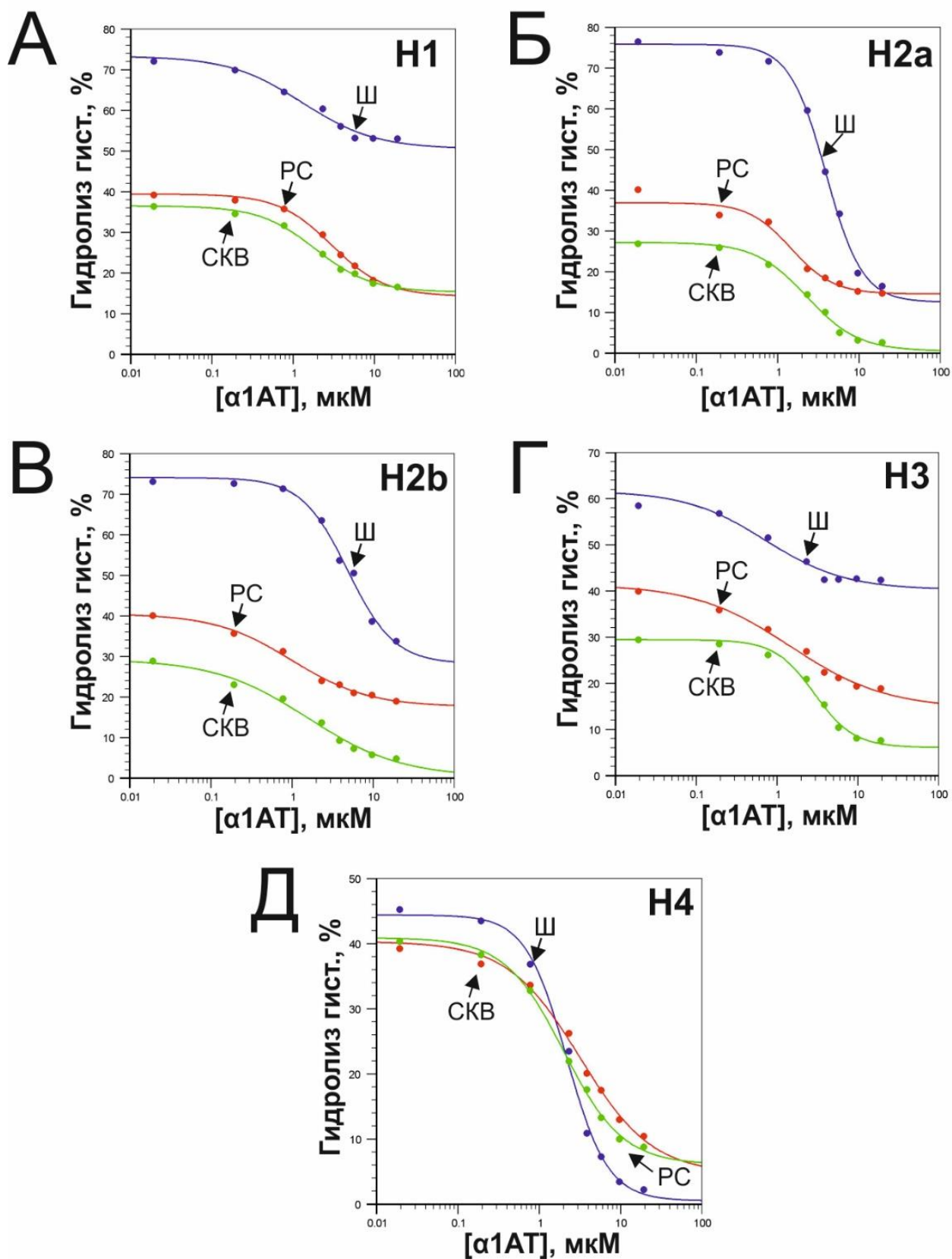
Поскольку выше показано, что основная часть гистон-гидролизующих IgG при шизофрении обладают свойствами протеаз серинового типа (см. рис. 34), представлялось интересным исследовать способность сывороточных ингибиторов протеаз оказывать влияние на каталитическую активность абзимов. Для этой цели был выбран сывороточный ковалентный ингибитор сериновых протеаз –  $\alpha$ 1-антитрипсин, известный также как  $\alpha$ 1-протеиназный ингибитор. Известно, что этот белок массой 50 кДа принадлежит к суперсемейству серпинов, обуславливает 92-94% общей антипротеолитической функции крови, выделяется в острой фазе воспалительной реакции и необходим для ограничения повреждения, вызванного активированными нейтрофильными гранулоцитами и их гидролитическими ферментами, которые разрушают эластин волокон соединительной ткани [440, 441].

Для оценки способности  $\alpha$ 1-антитрипсина ингибировать протеолитическую активность IgG в реакции гидролиза гистонов использовали ингибитор в диапазоне концентраций от 0 до 19,2 мкМ. Как видно из рис. 35, присутствие  $\alpha$ 1-антитрипсина в реакционной смеси приводит к значительному ингибированию активности, при этом  $\alpha$ 1-антитрипсин не влияет на гистоны. Ингибирование наблюдается уже при концентрации 0,8 мкМ  $\alpha$ 1-антитрипсина, но более выражено – при его концентрации, равной 3,8 мкМ. При концентрации 19,2 мкМ происходит ингибирование реакции гидролиза гистонов более чем на 80% (кроме гистона H1). Важно отметить, что гидролиз различных гистонов ингибируется в разной степени, меньше всего ингибируется гидролиз гистона H1.



**Рис. 35.** Ингибирование гистон-гидролизующей активности препарата IgG больного шизофренией под действием  $\alpha$ 1-антитрипсина. Дорожки К (1, 2) – интактные гистоны (H1, H2a, H2b, H3 и H4). Дорожки «K+ $\alpha$ 1-AT» (3, 4) – реакционные смеси, содержащие гистоны и  $\alpha$ 1-антитрипсин. На дорожки 6–12 в повторах нанесены реакционные смеси, содержащие гистоны, IgG (0,67 мМ) и  $\alpha$ 1-антитрипсин в указанной на рисунке концентрации. Дорожка М – маркеры молекулярной массы белков.

Данные о различном влиянии ингибитора на активность IgG также подтверждаются результатами анализа зависимости уровня гидролиза гистонов препаратами IgG различных больных от концентрации  $\alpha$ 1-антитрипсина (Рис. 36). Оказалось, что  $\alpha$ 1-антитрипсин обладал различным эффектом на препараты IgG больных РС и СКВ, при этом степень ингибирования зависела как от заболевания, так и от гидролизующего гистона. Например, гидролиз гистона H4 антителами больных шизофренией в присутствии  $\alpha$ 1-антитрипсина ингибировался практически полностью, в то время как гидролиз гистона H1 ингибировался только на 17%. В тоже время,  $\alpha$ 1-антитрипсин почти полностью ингибировал гидролиз гистонов H2a и H2b препаратом IgG больного СКВ, но гораздо хуже влиял на гидролиз других гистонов, а в случае IgG больного РС полного гидролиза не наблюдалось. Полученные данные объясняются тем, что для анализа использован суммарный пул препаратов IgG, среди которых присутствуют антитела не только с сериновым типом протеолитической активности, но и другими типами активности (кислые, тиоловые, металлопротеазы).



**Рис. 36.** Зависимость уровня гидролиза гистонов (%) препаратами IgG больных шизофренией (Ш), рассеянным склерозом (PC) и системной красной волчанкой (СКВ) от концентрации  $\alpha 1$ -антитрипсина. А, Б, В, Г, Д – гидролиз гистонов H1, H2a, H2b, H3 и H4 соответственно.

Данные о разнородности суммарного пула препаратов IgG по типу протеолитической активности согласуются с результатами ингибиторного анализа (см. рис. 34). Кроме того, разнородность эффектов  $\alpha$ 1-антитрипсина на уровень гидролиза гистонов различными препаратами IgG, также подтверждается данными анализа концентрации полумаксимального эффекта ( $EC_{50}$ ) (Таблица 11). Величины  $EC_{50}$  для  $\alpha$ 1-антитрипсина в реакциях гидролиза пяти гистонов индивидуальными препаратами IgG больных шизофренией, рассеянным склерозом и системной красной волчанкой значительно варьировали (от 0,99 до 4,89 мкМ), и отличались в 1,9–4,9 раз в зависимости от гидролизуемого гистона одним и тем же препаратом IgG. Известно, что средняя концентрация  $\alpha$ 1-антитрипсина в сыворотке составляет 0,9–2,3 г/л (25,9–44,2 мкМ) [440]. Учитывая, что концентрация IgG в сыворотке варьирует от 7 до 16 мг/мл (43,7–107 мкМ) [172], можно предположить, что в условиях организма уровень протеолитической активности IgG значительно ингибируется  $\alpha$ 1-антитрипсином.

**Таблица 11.** Концентрации полумаксимального эффекта ( $EC_{50}$ ) для  $\alpha$ 1-антитрипсина в реакциях гидролиза пяти гистонов индивидуальными препаратами IgG больных шизофренией, рассеянным склерозом и системной красной волчанкой.

Препараты IgG	Концентрация полумаксимального эффекта ( $EC_{50}$ ), мкМ				
	H1	H3	H2a	H2b	H4
IgG больного шизофренией	1,43 ± 0,35	0,99 ± 0,16	3,98 ± 0,25	4,89 ± 0,67	2,18 ± 0,2
IgG больного РС	3,03 ± 0,17	1,51 ± 0,4	1,33 ± 0,38	1,0 ± 0,18	3,07 ± 0,32
IgG больного СКВ	1,93 ± 0,17	3,02 ± 0,26	2,36 ± 0,27	1,57 ± 0,58	2,06 ± 0,13

Помимо этого, проанализировано влияние на протеолитическую активность IgG больных шизофрений другого ингибитора сериновых протеаз – апротинина. Этот белок относится к семейству ингибиторов протеаз с доменом Kunitz-типа [442]. Апротинин неспецифически ингибирует трипсин, химотрипсин, плазмин и другие сериновые протеазы по конкурентному механизму. По результатам проведенного анализа, апротинин в концентрации 1–154 мкМ приводил к ингибированию гистон-гидролизующей активности IgG, но менее выражено, чем  $\alpha$ 1-антитрипсин (см. рис. 6 II Приложения). Однако апротинин мигрирует при SDS-PAGE рядом с гистонами, тем самым сильно затрудняет анализ.

Таким образом, показано, что в присутствии  $\alpha 1$ -антитрипсина и апротинина гидролиз гистонов под действием IgG ингибируется, но не полностью. У каждого пациента нарабатывается свой репертуар протеолитических антител, среди которых находятся те, которые как ингибируются  $\alpha 1$ -антитрипсином, так и не ингибируются. Эти данные указывают на чрезвычайную гетерогенность репертуара абзимов при шизофрении и других заболеваниях. Исходя из полученных данных, белки  $\alpha 1$ -антитрипсин и апротинин можно рассматривать в качестве первых примеров специфических природных ингибиторов каталитических антител. В целом, можно предположить, что  $\alpha 1$ -антитрипсин служит для ограничения патологических эффектов каталитических антител и что абзимы являются частью системы протеаз и антипротеаз крови. Известно, что  $\alpha 1$ -антитрипсин – белок острой фазы и синтезируется в ответ на воспаление, но концентрация которого в крови постепенно снижается [440], а абзимы синтезируются при активации иммунной системы (см. п. 1.2.1), но на значительно большем промежутке времени. Поэтому, возможно, что абзимы при длительном течении заболевания, например, на поздних стадиях острого либо хронического воспаления, могут оказывать значимый эффект, поскольку их активность не будет полностью ингибироваться  $\alpha 1$ -антитрипсином. Кроме того, при недостаточной активности системы  $\alpha 1$ -антитрипсина, например, при мутациях в генах серпинов, к которым относится  $\alpha 1$ -антитрипсин, абзимы могут увеличивать свой патологический эффект. Необходимо изучить влияние других белков семейства серпинов на ингибирование протеолитической активности антител. Также нельзя исключить, что для каталитических антител с другими активностями существуют свои специфические ингибиторы, а активность системы каталитических антител тонко регулируется организмом.



## 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисфункция иммунной системы при шизофрении доказана многочисленными исследованиями [13–19]. Однако изучению гуморальной иммунной системы при шизофрении уделено недостаточно внимания. Основные направления исследований сосредоточены на поиске различных аутоантител [19], но при этом свойства иммуноглобулинов при шизофрении практически не изучены. В данной работе впервые исследовано разнообразие каталитических активностей IgG при шизофрении. Выявленное широкое разнообразие каталитических активностей антител, сходное с таковым при аутоиммунных заболеваниях, указывает на выраженные нарушения гуморальной иммунной системы при этом заболевании.

Полученные в работе данные значительно расширяют представления о неканонических функциях иммуноглобулинов человека [24]. Благодаря огромному разнообразию репертуара антител в организме, иммуноглобулины проявляют широкий спектр биологических функций. Полученные данные о способности IgG пациентов с шизофренией и здоровых доноров катализировать окислительно-восстановительные реакции позволяют предположить участие таких антител в защите организма от окислительного стресса. Несмотря на низкую каталитическую активность по сравнению с классическими антиоксидантными ферментами, IgG могут циркулировать в кровотоке длительное время и оказывать значимый эффект, однако вклад в общую антиоксидантную активность еще предстоит выяснить. Кроме того, учитывая способность антител накапливаться в очагах воспаления, каталитические IgG наряду с каталазой [380] могут участвовать в ограничении повреждений, вызванных высокой концентрацией  $H_2O_2$  и окислительными процессами в этих зонах.

Исследования в области каталитических антител ранее были сосредоточены на их негативной роли при различных заболеваниях. Учитывая важную роль воспаления в патогенезе шизофрении, а также данные о дисфункции апоптотической гибели клеток, что приводит к выходу ДНК, РНК и гистонов во внеклеточное пространство, можно предположить, что обнаруженные в данной работе антитела, гидролизующие эти молекулы, играют протективную роль при шизофрении. Разрушение этих молекул, вызывающих провоспалительные реакции, может способствовать минимизации воспалительных реакций. Однако нельзя исключить и патологическую роль образующихся каталитических антител при шизофрении, которая, например, может быть связана с перекрестной реактивностью гистон-гидролизующих IgG с ОБМ [225, 438]. Тем

не менее, роль каждого типа антител (ДНК-, РНК-, гистон-гидролизующих) индивидуальна в каждом конкретном случае.

В целом, образование каталитических антител связано с активацией иммунной системы и иммунологическими нарушениями, поэтому полученные данные о каталитической активности могут быть использованы, наряду с другими клинико-лабораторными показателями, для разработки критериев стратификации больных шизофренией по степени иммунной дисрегуляции. Стратификация больных позволит персонально рекомендовать применение различных противовоспалительных средств у подгрупп больных с выраженными иммунологическими нарушениями.

Полученные результаты о способности сывороточных ингибиторов сериновых протеаз  $\alpha$ 1-антитрипсина и апротинина ингибировать каталитическую активность IgG указывает на систему тонкой регуляции каталитической активности антител в организме. Полученные данные о новых функциях  $\alpha$ 1-антитрипсина и апротинина расширяют представления о биологической роли этих белков. Возможно,  $\alpha$ 1-антитрипсин и апротинин являются лишь первыми примерами специфических *природных ингибиторов каталитических антител*. Можно предположить, что в норме каталитическая активность абзимов достаточно точно контролируется природными сывороточными ингибиторами, причем для каждого типа абзимов в организме могут существовать специфические ингибиторы. Но при недостаточности этих ингибиторов, например, вследствие большой потребности в местах воспаления, или при избыточном образовании абзимов, каталитические антитела могут оказывать значимые эффекты. Эти предположения открывают большие перспективы по поиску новых природных ингибиторов каталитических антител и изучению их роли при различных заболеваниях.

## 5. ВЫВОДЫ

1. Гомогенные препараты IgG больных шизофренией проявляют широкий спектр каталитических активностей, которые являются собственным свойством антител. Во всех случаях IgG обладают высокой каталитической активностью по сравнению со здоровыми донорами. Изученные биохимические свойства (рН- и металлозависимость, специфичность, кинетические параметры) каталитических антител значительно отличаются от свойств канонических ферментов с аналогичной каталитической активностью. Сродство к субстрату всех исследуемых абзимов выше на 2–4 порядка, по сравнению с каноническими ферментами.
2. IgG больных шизофренией катализируют окислительно-восстановительные реакции.
  - Уровень пероксидазной и  $H_2O_2$ -независимой оксидоредуктазной активности IgG пациентов в реакции окисления 3,3'-диаминобензидина в 1,3 и 1,2 раза выше соответственно, чем IgG здоровых доноров.
  - Каталазная активность IgG больных шизофренией в 3,8 раза выше по сравнению со здоровыми донорами. Каталазная активность зависит от присутствия двухвалентных катионов.
3. Препараты IgG больных шизофренией обладают ДНК-, РНК- и гистон-гидролизующей активностями, но при этом не проявляют олигосахарид- и АТФ-гидролизующие активности.
  - Антитела с ДНК-гидролизующей активностью выявлены у 80% IgG больных шизофренией.
  - Все препараты IgG обладают РНК-гидролизующей активностью. Гидролиз микроРНК под действием IgG больных шизофренией является сайт-специфическим, поскольку основные сайты гидролиза различными антителами совпадают. Уровни сСМР- и микроРНК-гидролизующих активностей коррелируют с клиническими параметрами шизофрении.
  - Уровень гистон-гидролизующей активности препаратов IgG пациентов в 6,1–20,2 раза выше, чем у здоровых доноров; показана его корреляция с клиническими особенностями заболевания. Впервые обнаружен активирующий эффект ионов  $Ca^{2+}$  на активность.
  - IgG пациентов гидролизуют ДНК, микроРНК и гистоны с сопоставимой эффективностью, что подтверждается результатами корреляционного анализа.
4. Образование каталитических антител при шизофрении указывает на некоторые общие механизмы иммунных нарушений, характерных для аутоиммунных заболеваний.

5. Гистон-гидролизующая активность IgG снижается в присутствии сывороточных ингибиторов сериновых протеаз  $\alpha$ 1-антитрипсина и апротинина пропорционально их концентрации, что, по-видимому, указывает на систему тонкой регуляции каталитической активности антител организмом.

## 6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McCutcheon R. A., Marques T. R., Howes O. D. Schizophrenia—an overview // *JAMA psychiatry*. – 2020. – V. 77. – №. 2. – P. 201-210.
2. Nichols E., Szoek C. E., Vollset S. E., Abbasi N., Abd-Allah F., Abdela J., Aichour M. T. E., Akinyemi R. O., Alahdab F., Asgedom S.W. et al. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *The Lancet Neurology*. – 2019. – V. 18. – №. 1. – P. 88-106.
3. Wallin M. T., Culpepper W. J., Nichols E., Bhutta Z. A., Gebrehiwot T. T., Hay S. I., Khalil I. A., Krohn K.J., Liang X., Naghavi M. et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *The Lancet Neurology*. – 2019. – V. 18. – №. 3. – P. 269-285.
4. Vos T., Abajobir A. A., Abate K. H., Abbafati C., Abbas K. M., Abd-Allah F., Abdulkader R. S., Abdulle A. M., Abebo T. A., Abera S. F., et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *The Lancet*. – 2017. – V. 390. – №. 10100. – P. 1211-1259.
5. Carlsson A., Waters N., Carlsson M. L. Neurotransmitter interactions in schizophrenia—therapeutic implications // *Biological psychiatry*. – 1999. – V. 46. – №. 10. – P. 1388-1395.
6. Howes O. D., Kambeitz J., Kim E., Stahl D., Slifstein M., Abi-Dargham A., Kapur S. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment: meta-analysis of imaging studies // *Archives of general psychiatry*. – 2012. – V. 69. – №. 8. – P. 776-786.
7. Moghaddam B., Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment // *Neuropsychopharmacology*. – 2012. – V. 37. – №. 1. – P. 4-15.
8. Aghajanian G. K., Marek G. J. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms // *Brain research reviews*. – 2000. – V. 31. – №. 2-3. – P. 302-312.
9. Carlsson A., Waters N., Holm-Waters S., Tedroff J., Nilsson M., Carlsson M. L. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 2001. – V. 41. – №. 1. – P. 237-260.
10. Sawa A., Snyder S. H. Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease // *Science*. – 2002. – V. 296. – №. 5568. – P. 692-695.
11. Murray R. M., Lewis S. W. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? // *British medical journal (Clinical research ed.)*. – 1987. – V. 295. – №. 6600. – P. 681.
12. Boskovic M., Vovk T., Blanka K. P., Iztok G. Oxidative stress in schizophrenia // *Current neuropharmacology*. – 2011. – V. 9. – №. 2. – P. 301-312.
13. Pape K., Tamouza R., Leboyer M., Zipp F. Immunoneuropsychiatry—novel perspectives on brain disorders // *Nature Reviews Neurology*. – 2019. – V. 15. – №. 6. – P. 317-328.
14. Pedraz-Petrozzi B., Elyamany O., Rummel C., Mulert C. Effects of inflammation on the kynurenine pathway in schizophrenia—a systematic review // *Journal of Neuroinflammation*. – 2020. – V. 17. – №. 1. – P. 1-17.
15. Fond G., Lançon C., Korchia T., Auquier P., Boyer L. The Role of Inflammation in the Treatment of Schizophrenia // *Frontiers in Psychiatry*. – 2020. – V. 11. – P. 160.
16. Uptegrove R., Khandaker G. M. Cytokines, oxidative stress and cellular markers of inflammation in schizophrenia // *Neuroinflammation and Schizophrenia*. – 2019. – P. 49-66.
17. Muller N., Schwarz M. J. The role of immune system in schizophrenia // *Current immunology reviews*. – 2010. – V. 6. – №. 3. – P. 213-220.
18. Rothermundt M., Arolt V., Bayer T. A. Review of immunological and immunopathological findings in schizophrenia // *Brain, behavior, and immunity*. – 2001. – V. 15. – №. 4. – P. 319-339.
19. Ezeoke A., Mellor A., Buckley P., Miller B. A systematic, quantitative review of blood autoantibodies in schizophrenia // *Schizophrenia research*. – 2013. – V. 150. – №. 1. – P. 245-251.
20. Forthal D. N. Functions of antibodies // *Antibodies for Infectious Diseases*. – 2015. – P. 23-48.

- 
21. Avrameas S., Alexopoulos H., Moutsopoulos H. M. Natural Autoantibodies: An Undersugn Hero of the Immune System and Autoimmune Disorders—A Point of View // *Frontiers in immunology*. – 2018. – V. 9. – P. 1320.
22. Nagele E. P., Han M., Acharya N. K., DeMarshall C., Kosciuk M. C., Nagele R. G. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 4. – P. e60726.
23. Coutinho A., Kazatchkine M. D., Avrameas S. Natural autoantibodies // *Current opinion in immunology*. – 1995. – V. 7. – №. 6. – P. 812-818.
24. Dimitrov J. D., Lacroix-Desmazes S. Noncanonical Functions of Antibodies // *Trends in Immunology*. – 2020. – V. 41. – №. 5. – P. 379-393.
25. Benkovic S. J. Catalytic antibodies // *Annual review of biochemistry*. – 1992. – V. 61. – №. 1. – P. 29-54.
26. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Natural catalytic antibodies—abzymes // *Catalytic antibodies*. – 2005. – P. 503-567.
27. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2003. – V. 7. – №. 3. – P. 265-276.
28. Insel T. R. Rethinking schizophrenia // *Nature*. – 2010. – V. 468. – №. 7321. – P. 187-193.
29. Fleischhacker W. W., Arango C., Arteel P., Barnes T. R., Carpenter W., Duckworth K., Galderisi S., Halpern L., Knapp M., Marder S. R., Moller M., Sartorius N., Woodruff P. Schizophrenia—time to commit to policy change // *Schizophrenia bulletin*. – 2014. – V. 40. – №. Suppl\_3. – P. S165-S194.
30. Любов Е. Б., Ястребов В. С., Шевченко Л. С., Чапурин С. А., Чурилин Ю. Ю., Бьлим И. А., Гажа А. К., Доронин В. В., Косов А. М., Петухов Ю.Л., Фадеев, П. Н. Экономическое бремя шизофрении в России // *Социальная и клиническая психиатрия*. – 2012. – Т. 22. – №. 3. – С. 36-42.
31. Тиганов А. С. и др. Руководство по психиатрии // М.: Медицина. – 1999. – Т. 1. – С. 712.
32. Tost H., Alam T., Meyer-Lindenberg A. Dopamine and psychosis: theory, pathomechanisms and intermediate phenotypes // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2010. – V. 34. – №. 5. – P. 689-700.
33. Grace A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2016. – V. 17. – №. 8. – P. 524.
34. Abi-Dargham A., Mawlawi O., Lombardo I., Gil R., Martinez D., Huang Y., Hwang D. R., Keilp J., Kochan L., Van Heertum R., Gorman J. M., Laruelle M. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia // *Journal of Neuroscience*. – 2002. – V. 22. – №. 9. – P. 3708-3719.
35. Weinstein J. J., Chohan M. O., Slifstein M., Kegeles L. S., Moore H., Abi-Dargham A. Pathway-specific dopamine abnormalities in schizophrenia // *Biological psychiatry*. – 2017. – V. 81. – №. 1. – P. 31-42.
36. Lisman J. E., Coyle J. T., Green R. W., Javitt D. C., Benes F. M., Heckers S., Grace A. A. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia // *Trends in neurosciences*. – 2008. – V. 31. – №. 5. – P. 234-242.
37. Reynolds G. P., Beasley C. L., Zhang Z. J. Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons // *Journal of neural transmission*. – 2002. – V. 109. – №. 5-6. – P. 881-889.
38. Tsai S. J. Central N-acetyl aspartylglutamate deficit: a possible pathogenesis of schizophrenia // *Medical science monitor*. – 2005. – V. 11. – №. 9. – P. HY39-HY45.
39. Neale J. H., Olszewski R. T., Zuo D., Janczura K. J., Profaci C. P., Lavin K. M., Madore J. C., Bzdega, T. Advances in understanding the peptide neurotransmitter NAAG and appearance of a new member of the NAAG neuropeptide family // *Journal of neurochemistry*. – 2011. – V. 118. – №. 4. – P. 490-498.
40. Marín O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2012. – V. 13. – №. 2. – P. 107-120.
41. Burbaeva G. S., Boksha I. S., Turishcheva M. S., Vorobyeva E. A., Savushkina O. K., Tereshkina E. B. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2003. – V. 27. – №. 4. – P. 675-680.

- 
42. Glausier J. R., Lewis D. A. Mapping pathologic circuitry in schizophrenia // Handbook of clinical neurology. – Elsevier, 2018. – V. 150. – P. 389-417.
43. Abi-Dargham A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia // International review of neurobiology. – 2007. – V. 78. – P. 133-164.
44. Stahl S. M. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate // CNS spectrums. – 2018. – V. 23. – №. 3. – P. 187-191.
45. Tandon R., Keshavan M. S., Nasrallah H. A. Schizophrenia, “just the facts” what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology // Schizophrenia research. – 2008. – V. 102. – №. 1-3. – P. 1-18.
46. Faraone S. V., Taylor L., Tsuang M. The molecular genetics of schizophrenia: an emerging consensus // Expert reviews in molecular medicine. – 2002. – V. 4. – №. 14. – P. 1.
47. Hilker R., Helenius D., Fagerlund B., Skytthe A., Christensen K., Werge T. M., Nordentoft M., Glenthøj B. Heritability of schizophrenia and schizophrenia spectrum based on the nationwide Danish twin register // Biological psychiatry. – 2018. – V. 83. – №. 6. – P. 492-498.
48. St Clair D. Copy number variation and schizophrenia // Schizophrenia bulletin. – 2009. – V. 35. – №. 1. – P. 9-12.
49. International Schizophrenia Consortium. Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia // Nature. – 2008. – V. 455. – №. 7210. – P. 237.
50. Chowdari K. V., Bamne M. N., Nimgaonkar V. L. Genetic association studies of antioxidant pathway genes and schizophrenia // Antioxidants & redox signaling. – 2011. – V. 15. – №. 7. – P. 2037-2045.
51. International Schizophrenia Consortium. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia that overlaps with bipolar disorder // Nature. – 2009. – V. 460. – №. 7256. – P. 748.
52. Ripke S., Sanders A. R., Kendler K. S., Levinson D. F., Sklar P., Holmans P. A., Lin D. Y., Duan J., Ophoff R. A., Andreassen O. A., et al. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci // Nature genetics. – 2011. – V. 43. – №. 10. – P. 969.
53. Ripke S., O'Dushlaine C., Chambert K., Moran J. L., Kähler A. K., Akterin S., Bergen S. E., Collins A. L., Crowley J. J., Fromer M., Kim Y., Lee S. H., Magnusson P. K., Sanchez N., Stahl E. A., Williams S., Wray N. R., Xia K., Bettella F., Borglum A. D., Bulik-Sullivan B. K., Cormican P., Craddock N., de Leeuw C., Durmishi N., Gill M., Golimbet V., Hamshere M. L., Holmans P., Hougaard D. M., Kendler K. S., Lin K., Morris D. W., Mors O., Mortensen P. B., Neale B. M., O'Neill F. A., Owen M. J., Milovancevic M. P., Posthuma D., Powell J., Richards A. L., Riley B. P., Ruderfer D., Rujescu D., Sigurdsson E., Silagadze T., Smit A. B., Stefansson H., Steinberg S., Suvisaari J., Tosato S., Verhage M., Walters J. T.; Multicenter Genetic Studies of Schizophrenia Consortium; Psychosis Endophenotypes International Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Donnelly P., Barroso I., Blackwell J. M., Bramon E., Brown M. A., Casas J. P., Corvin A. P., Deloukas P., Duncanson A., Jankowski J., Markus H. S., Mathew C. G., Palmer C. N., Plomin R., Rautanen A., Sawcer S. J., Trembath R. C., Viswanathan A. C., Wood N. W., Spencer C. C., Band G., Bellenguez C., Freeman C., Hellenthal G., Giannoulatou E., Pirinen M., Pearson R. D., Strange A., Su Z., Vukcevic D., Donnelly P., Langford C., Hunt S. E., Edkins S., Gwilliam R., Blackburn H., Bumpstead S. J., Dronov S., Gillman M., Gray E., Hammond N., Jayakumar A., McCann O. T., Liddle J., Potter S. C., Ravindrarajah R., Ricketts M., Tashakkori-Ghanbaria A., Waller M. J., Weston P., Widaa S., Whittaker P., Barroso I., Deloukas P., Mathew C. G., Blackwell J. M., Brown M. A., Corvin A. P., McCarthy M. I., Spencer C. C., Bramon E., Corvin A. P., O'Donovan M. C., Stefansson K., Scolnick E., Purcell S., McCarroll S. A., Sklar P., Hultman C. M., Sullivan P. F. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia // Nature genetics. – 2013. – V. 45. – №. 10. – P. 1150.
54. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci // Nature. – 2014. – V. 511. – №. 7510. – P. 421-427.
55. Sekar A., Bialas A. R., de Rivera H., Davis A., Hammond T. R., Kamitaki N., Tooley K., Presumey J., Baum M., Van Doren V., Genovese G., Rose S.A., Handsaker R.E.; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Daly M.J., Carroll M.C., Stevens B., McCarroll S.A. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4 // Nature. – 2016. – V. 530. – №. 7589. – P. 177-183.
56. Maric N., Svrakic D. Why schizophrenia genetics needs epigenetics: a review // Psychiatria Danubina. – 2012. – V. 24. – №. 1. – P. 2-18.

57. Li M., Santpere G., Kawasawa Y. I., Evgrafov O. V., Gulden F. O., Pochareddy S., Sunkin S. M., Li Z., Shin Y., Zhu Y., Sousa A. M. M., Werling D. M., Kitchen R. R., Kang H. J., Pletikos M., Choi J., Muchnik S., Xu X., Wang D., Lorente-Galdos B., Liu S., Giusti-Rodríguez P., Won H., de Leeuw C. A., Pardiñas A. F.; BrainSpan Consortium; PsychENCODE Consortium; PsychENCODE Developmental Subgroup, Hu M., Jin F., Li Y., Owen M. J., O'Donovan M. C., Walters J. T. R., Posthuma D., Reimers M. A., Levitt P., Weinberger D. R., Hyde T. M., Kleinman J. E., Geschwind D. H., Hawrylycz M. J., State M. W., Sanders S. J., Sullivan P. F., Gerstein M. B., Lein E. S., Knowles J. A., Sestan N. Integrative functional genomic analysis of human brain development and neuropsychiatric risks // *Science*. – 2018. – V. 362. – №. 6420. – P. eaat7615
58. Gandal M. J., Zhang P., Hadjimichael E., Walker R. L., Chen C., Liu S., Won H., van Bakel H., Varghese M., Wang Y., Shieh A. W., Haney J., Parhami S., Belmont J., Kim M., Moran Losada P., Khan Z., Mleczko J., Xia Y., Dai R., Wang D., Yang Y. T., Xu M., Fish K., Hof P. R., Warrell J., Fitzgerald D., White K., Jaffe A. E.; PsychENCODE Consortium, Peters M. A., Gerstein M., Liu C., Iakoucheva L. M., Pinto D., Geschwind D. H. Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder // *Science*. – 2018. – V. 362. – №. 6420. – P. eaat8127.
59. Gibbons A., Udawela M., Dean B. Non-coding RNA as novel players in the pathophysiology of schizophrenia // *Non-coding RNA*. – 2018. – V. 4. – №. 2. – P. 11.
60. Krol J., Loedige I., Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay // *Nature Reviews Genetics*. – 2010. – V. 11. – №. 9. – P. 597-610.
61. Creemers E. E., Tijssen A. J., Pinto Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? // *Circulation research*. – 2012. – V. 110. – №. 3. – P. 483-495.
62. Tang Y., Liu D., Zhang L., Ingvarsson S., Chen H. Quantitative analysis of miRNA expression in seven human foetal and adult organs // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – №. 12. – P. e28730.
63. Beveridge N. J., Santarelli D. M., Wang X., Tooney P. A., Webster M. J., Weickert C. S., Cairns M. J. Maturation of the human dorsolateral prefrontal cortex coincides with a dynamic shift in microRNA expression // *Schizophrenia bulletin*. – 2014. – V. 40. – №. 2. – P. 399-409.
64. Sun X. Y., Lu J., Zhang L., Song H. T., Zhao L., Fan H. M., Zhong A. F., Niu W., Guo Z. M., Dai Y. H., Chen C., Ding Y. F., Zhang L. Y. Aberrant microRNA expression in peripheral plasma and mononuclear cells as specific blood-based biomarkers in schizophrenia patients // *Journal of clinical neuroscience*. – 2015. – V. 22. – №. 3. – P. 570-574.
65. Lai C. Y., Lee S. Y., Scarr E., Yu Y. H., Lin Y. T., Liu C. M., Hwang T. J., Hsieh M. H., Liu C. C., Chien Y. L., Udawela M., Gibbons A. S., Everall I. P., Hwu H. G., Dean B., Chen W. J. Aberrant expression of microRNAs as biomarker for schizophrenia: from acute state to partial remission, and from peripheral blood to cortical tissue // *Translational psychiatry*. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. e717-e717.
66. Moreau M. P., Bruse S. E., David-Rus R., Buyske S., Brzustowicz L. M. Altered microRNA expression profiles in postmortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder // *Biological psychiatry*. – 2011. – V. 69. – №. 2. – P. 188-193.
67. Beveridge N. J., Cairns M. J. MicroRNA dysregulation in schizophrenia // *Neurobiology of disease*. – 2012. – V. 46. – №. 2. – P. 263-271.
68. Hauberg M. E., Roussos P., Grove J., Børglum A. D., Mattheisen, M. Analyzing the role of microRNAs in schizophrenia in the context of common genetic risk variants // *JAMA psychiatry*. – 2016. – V. 73. – №. 4. – P. 369-377.
69. Yin J., Lin J., Luo X., Chen Y., Li Z., Ma G., Li K. miR-137: a new player in schizophrenia // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – V. 15. – №. 2. – P. 3262-3271.
70. Olde Loohuis N. F., Ba W., Stoerchel P. H., Kos A., Jager A., Schrott G., Martens G. J., van Bokhoven H., Nadif Kasri N., Aschrafi A. MicroRNA-137 controls AMPA-receptor-mediated transmission and mGluR-dependent LTD // *Cell reports*. – 2015. – V. 11. – №. 12. – P. 1876-1884.
71. Siegert S., Seo J., Kwon E. J., Rudenko A., Cho S., Wang W., Flood Z., Martorell A. J., Ericsson M., Mungenast A. E., Tsai L. H. The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity // *Nature neuroscience*. – 2015. – V. 18. – №. 7. – P. 1008-1016.
72. Cheng Y., Wang Z. M., Tan W., Wang X., Li Y., Bai B., Li Y., Zhang S. F., Yan H. L., Chen Z. L., Liu C. M., Mi T. W., Xia S., Zhou Z., Liu A., Tang G. B., Liu C., Dai Z. J., Wang Y. Y., Wang H., Wang X., Kang Y., Lin L., Chen Z., Xie N., Sun Q., Xie W., Peng J., Chen D., Teng Z. Q., Jin P. Partial loss of psychiatric risk gene Mir137 in mice causes repetitive behavior and impairs sociability and learning via increased Pde10a // *Nature neuroscience*. – 2018. – V. 21. – №. 12. – P. 1689-1703.



73. Topol A., Zhu S., Hartley B. J., English J., Hauberg M. E., Tran N., Rittenhouse C. A., Simone A., Ruderfer D. M., Johnson J., Readhead B., Hadas Y., Gochman P. A., Wang Y. C., Shah H., Cagney G., Rapoport J., Gage F. H., Dudley J. T., Sklar P., Mattheisen M., Cotter D., Fang G., Brennand K. J. Dysregulation of miRNA-9 in a subset of schizophrenia patient-derived neural progenitor cells // *Cell reports*. – 2016. – V. 15. – №. 5. – P. 1024-1036.
74. Dugas J. C., Cuellar T. L., Scholze A., Ason B., Ibrahim A., Emery B., Zamanian J. L., Foo L. C., McManus M. T., Barres B. A. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination // *Neuron*. – 2010. – V. 65. – №. 5. – P. 597-611.
75. Fatemi S. H., Folsom T. D. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited // *Schizophrenia bulletin*. – 2009. – V. 35. – №. 3. – P. 528-548.
76. Suddath R. L., Christison G. W., Torrey E. F., Casanova M. F., Weinberger D. R. Anatomical abnormalities in the brains of monozygotic twins discordant for schizophrenia // *New England Journal of Medicine*. – 1990. – V. 322. – №. 12. – P. 789-794.
77. Shenton M. E., Dickey C. C., Frumin M., McCarley R. W. A review of MRI findings in schizophrenia // *Schizophrenia research*. – 2001. – V. 49. – №. 1-2. – P. 1-52.
78. Van Erp T. G. M., Walton E., Hibar D. P., Schmaal L., Jiang W., Glahn D. C., Pearlson G. D., Yao N., Fukunaga M., Hashimoto R., et al. Cortical brain abnormalities in 4474 individuals with schizophrenia and 5098 control subjects via the Enhancing Neuro Imaging Genetics Through Meta Analysis (ENIGMA) Consortium // *Biological psychiatry*. – 2018. – V. 84. – №. 9. – P. 644-654.
79. Greenstein D., Lerch J., Shaw P., Clasen L., Giedd J., Gochman P., Rapoport J., Gogtay N. Childhood onset schizophrenia: cortical brain abnormalities as young adults // *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. – 2006. – V. 47. – №. 10. – P. 1003-1012.
80. Ellison-Wright I., Bullmore E. Meta-analysis of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia // *Schizophrenia research*. – 2009. – V. 108. – №. 1-3. – P. 3-10.
81. Glantz L. A., Lewis D. A. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia // *Archives of general psychiatry*. – 2000. – V. 57. – №. 1. – P. 65-73.
82. Uranova N., Orlovskaya D., Vikhрева O., Zimina I., Kolomeets N., Vostrikov V., Rachmanova V. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness // *Brain research bulletin*. – 2001. – V. 55. – №. 5. – P. 597-610.
83. Martins-De-Souza D., Dias-Neto E., Schmitt A., Falkai P., Gormanns P., Maccarrone G., Turck C. W., Gattaz W. F. Proteome analysis of schizophrenia brain tissue // *The World Journal of Biological Psychiatry*. – 2010. – V. 11. – №. 2. – P. 110-120.
84. Nascimento J. M., Martins-de-Souza D. The proteome of schizophrenia // *npj Schizophrenia*. – 2015. – V. 1. – №. 1. – P. 1-11.
85. Kim S., Webster M. J. Correlation analysis between genome-wide expression profiles and cytoarchitectural abnormalities in the prefrontal cortex of psychiatric disorders // *Molecular psychiatry*. – 2010. – V. 15. – №. 3. – P. 326-336.
86. Zhao Z., Xu J., Chen J., Kim S., Reimers M., Bacanu S. A., Yu H., Liu C., Sun J., Wang Q., Jia P., Xu F., Zhang Y., Kendler K. S., Peng Z., Chen X. Transcriptome sequencing and genome-wide association analyses reveal lysosomal function and actin cytoskeleton remodeling in schizophrenia and bipolar disorder // *Molecular psychiatry*. – 2015. – V. 20. – №. 5. – P. 563-572.
87. Callicott, J. H., Straub R. E., Pezawas L., Egan M. F., Mattay V. S., Hariri A. R., Verchinski B. A., Meyer-Lindenberg A., Balkissoon R., Kolachana B., Goldberg T. E., Weinberger D. R. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102. – №. 24. – P. 8627-8632.
88. Mei L., Xiong W. C. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2008. – V. 9. – №. 6. – P. 437-452.
89. Wang R., Wang Y., Hu R., Chen X., Song M., Wang, X. Decreased plasma levels of neureglin-1 in drug naïve patients and chronic patients with schizophrenia // *Neuroscience letters*. – 2015. – V. 606. – P. 220-224.
90. Rapoport J. L., Addington A. M., Frangou S., Psych M. R. C. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005 // *Molecular psychiatry*. – 2005. – V. 10. – №. 5. – P. 434-449.
91. Rapoport J. L., Giedd J. N., Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012 // *Molecular psychiatry*. – 2012. – V. 17. – №. 12. – P. 1228-1238.

92. Maynard T. M., Sikich L., Lieberman J. A., LaMantia A. S. Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia // *Schizophrenia bulletin*. – 2001. – V. 27. – №. 3. – P. 457-476.
93. Weinberger D. R., McClure R. K. Neurotoxicity, neuroplasticity, and magnetic resonance imaging morphometry: what is happening in the schizophrenic brain? // *Archives of general psychiatry*. – 2002. – V. 59. – №. 6. – P. 553-558.
94. Меньщикова, Е. Б., Ланкин, В. З., Зенков, Н. К., Бондарь, И. А., Круговых, Н. Ф., Труфакин, В. А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
95. Меньщикова, Е. Б., Зенков, Н. К., Ланкин, В. З., Бондарь, И. А., Труфакин, В. А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
96. Do K. Q., Cabungcal J. H., Frank A., Steullet P., Cuenod, M. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia // *Current opinion in neurobiology*. – 2009. – V. 19. – №. 2. – P. 220-230.
97. Hastings T. G. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase // *Journal of neurochemistry*. – 1995. – V. 64. – №. 2. – P. 919-924.
98. Bitanihirwe B. K. Y., Woo T. U. W. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2011. – V. 35. – №. 3. – P. 878-893.
99. Ng F., Berk M., Dean O., Bush A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2008. – V. 11. – №. 6. – P. 851-876.
100. Yao J. K., Keshavan M. S. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view // *Antioxidants & redox signaling*. – 2011. – V. 15. – №. 7. – P. 2011-2035.
101. Wu J. Q., Kosten T. R., Zhang X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – V. 46. – P. 200-206.
102. Koga M., Serritella A. V., Sawa A., Sedlak T. W. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis // *Schizophrenia research*. – 2016. – V. 176. – №. 1. – P. 52-71.
103. Kumar J., Liddle E. B., Fernandes C. C., Palaniyappan L., Hall E. L., Robson S. E., Simmonite M., Fiesel J., Katshu M. Z., Qureshi A., Skelton M., Christodoulou N. G., Brookes M. J., Morris P. G., Liddle P. F. Glutathione and glutamate in schizophrenia: a 7T MRS study // *Molecular psychiatry*. – 2018. – V. 25. – №. 4. – P. 873-882.
104. Кротенко Н. М., Смирнова Л. П., Логинов В. Н., Иванова А. С., Семке А. В. Влияние нейролептической терапии на состояние перекисного окисления липидов и систему глутатиона у больных шизофренией // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. – 2010. – №. 2. – С. 133-135.
105. Щигорева Ю. Г., Бойко А. С., Кротенко Н. М., Смирнова Л. П., Корнетова Е. Г., Семке А. В., Иванова С. А. Глутатион как критерий прогноза риска лекарственно-индуцированной поздней дискинезии у больных шизофренией // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. – 2012. – №. 6. – С. 75-78.
106. Иванова С. А., Смирнова Л. П., Щигорева Ю. Г., Семке А. В., Бохан Н. А. Глутатион в сыворотке крови больных шизофренией в динамике антипсихотической терапии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2015. – Т. 160. – №. 8. – С. 255-258.
107. Raffa M., Atig F., Mhalla A., Kerkeni A., Mechri A. Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naïve first-episode schizophrenic patients // *BMC psychiatry*. – 2011. – V. 11. – №. 1. – P. 124.
108. Altuntas I., Aksoy H., Coskun I., Çayköylü A., Akçay F. Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2000. – V. 38. – №. 12. – P. 1277-1281.
109. Do K. Q., Trabesinger A. H., Kirsten-Krüger M., Lauer C. J., Dydak U., Hell D., Holsboer F., Boesiger P., Cuénod M. Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo // *European Journal of Neuroscience*. – 2000. – V. 12. – №. 10. – P. 3721-3728.
110. Иванова С. А., Смирнова Л. П., Щигорева Ю. Г., Бойко А. С., Семке А. В., Узбеков М. Г., Бохан Н. А. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы в эритроцитах больных

- шизофренией в динамике фармакотерапии традиционными антипсихотическими препаратами // *Нейрохимия*. – 2014. – Т. 31. – №. 1. – С. 79-79.
111. Flatow J., Buckley P., Miller B. J. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia // *Biological psychiatry*. – 2013. – V. 74. – №. 6. – P. 400-409.
112. Srivastava R., Faust T., Ramos A., Ishizuka K., Sawa A. Dynamic changes of the mitochondria in psychiatric illnesses: new mechanistic insights from human neuronal models // *Biological psychiatry*. – 2018. – V. 83. – №. 9. – P. 751-760.
113. Prabakaran S., Swatton J. E., Ryan M. M., Huffaker S. J., Huang J. T., Griffin J. L., Wayland M., Freeman T., Dudbridge F., Lilley K. S., Karp N. A., Hester S., Tkachev D., Mimmack M. L., Yolken R. H., Webster M. J., Torrey E. F., Bahn S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress // *Molecular psychiatry*. – 2004. – V. 9. – №. 7. – P. 684-697.
114. Maas D. A., Vallès A., Martens G. J. M. Oxidative stress, prefrontal cortex hypomyelination and cognitive symptoms in schizophrenia // *Translational psychiatry*. – 2017. – V. 7. – №. 7. – P. e1171-e1171.
115. Alameda L., Fournier M., Khadimallah I., Griffa A., Cleusix M., Jenni R., Ferrari C., Klauser P., Baumann P. S., Cuenod M., Hagmann P., Conus P., Do K. Q. Redox dysregulation as a link between childhood trauma and psychopathological and neurocognitive profile in patients with early psychosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – V. 115. – №. 49. – P. 12495-12500.
116. Langbein K., Hesse J., Gussew A., Milleit B., Lavoie S., Amminger G. P., Gaser C., Wagner G., Reichenbach J. R., Hipler U. C., Winter D., Smesny S. Disturbed glutathione antioxidative defense is associated with structural brain changes in neuroleptic-naïve first-episode psychosis patients // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. – 2018. – V. 136. – P. 103-110.
117. Weismann D., Hartvigsen K., Lauer N., Bennett K. L., Scholl H. P., Charbel Issa P., Cano M., Brandstätter H., Tsimikas S., Skerka C., Superti-Furga G., Handa J. T., Zipfel P. F., Witztum J. L., Binder C. J. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress // *Nature*. – 2011. – V. 478. – №. 7367. – P. 76-81.
118. Steullet P., Cabungcal J. H., Monin A., Dwir D., O'Donnell P., Cuenod M., Do K. Q. Redox dysregulation, neuroinflammation, and NMDA receptor hypofunction: a “central hub” in schizophrenia pathophysiology? // *Schizophrenia research*. – 2016. – V. 176. – №. 1. – P. 41-51.
119. Hardingham G. E., Do K. Q. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2016. – V. 17. – №. 2. – P. 125.
120. Hasam-Henderson L. A., Gotti G. C., Mishto M., Klisch C., Gerevich Z., Geiger J. R., Kovács R. NMDA-receptor inhibition and oxidative stress during hippocampal maturation differentially alter parvalbumin expression and gamma-band activity // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 1-17.
121. Strous R. D., Shoenfeld Y. Schizophrenia, autoimmunity and immune system dysregulation: a comprehensive model updated and revisited // *Journal of autoimmunity*. – 2006. – V. 27. – №. 2. – P. 71-80.
122. Müller N., Schwarz M. Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission // *Neurotoxicity research*. – 2006. – V. 10. – №. 2. – P. 131-148.
123. Müller N., Weidinger E., Leitner B., Schwarz M. J. The role of inflammation in schizophrenia // *Frontiers in neuroscience*. – 2015. – V. 9. – P. 372.
124. Müller N. Inflammation in schizophrenia: pathogenetic aspects and therapeutic considerations // *Schizophrenia bulletin*. – 2018. – V. 44. – №. 5. – P. 973-982.
125. Kirkpatrick B., Miller B. J. Inflammation and schizophrenia // *Schizophrenia bulletin*. – 2013. – V. 39. – №. 6. – P. 1174-1179.
126. Khandaker G. M., Cousins L., Deakin J., Lennox B. R., Yolken R., Jones P. B. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment // *The Lancet Psychiatry*. – 2015. – V. 2. – №. 3. – P. 258-270.
127. Bergink V., Gibney S. M., Drexhage H. A. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers // *Biological psychiatry*. – 2014. – V. 75. – №. 4. – P. 324-331.
128. Bechter K. Updating the mild encephalitis hypothesis of schizophrenia // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – V. 42. – P. 71-91.
129. Potvin S., Stip E., Sepehry A. A., Gendron A., Bah R., Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review // *Biological psychiatry*. – 2008. – V. 63. – №. 8. – P. 801-808.

130. Miller B. J., Buckley P., Seabolt W., Mellor A., Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects // *Biological psychiatry*. – 2011. – V. 70. – №. 7. – P. 663-671.
131. Frydecka D., Krzystek-Korpacka M., Lubeiro A., Stramecki F., Stańczykiewicz B., Beszlej J. A., Piotrowski P., Kotowicz K., Szewczuk-Bogusławska M., Pawlak-Adamska E., Misiak B. Profiling inflammatory signatures of schizophrenia: a cross-sectional and meta-analysis study // *Brain, behavior, and immunity*. – 2018. – V. 71. – P. 28-36.
132. Orlovska-Waast S., Köhler-Forsberg O., Brix S. W., Nordentoft M., Kondziella D., Krogh J., Benros M. E. Cerebrospinal fluid markers of inflammation and infections in schizophrenia and affective disorders: a systematic review and meta-analysis // *Molecular psychiatry*. – 2019. – V. 24. – №. 6. – P. 869-887.
133. Drexhage R. C., Hoogenboezem T. A., Cohen D., Versnel M. A., Nolen W. A., van Beveren N. J., Drexhage, H. A. An activated set point of T-cell and monocyte inflammatory networks in recent-onset schizophrenia patients involves both pro-and anti-inflammatory forces // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2011. – V. 14. – №. 6. – P. 746-755.
134. Drexhage R. C., van der Heul-Nieuwenhuijsen L., Padmos R. C., van Beveren N., Cohen D., Versnel M. A., Nolen W. A., Drexhage H. A. Inflammatory gene expression in monocytes of patients with schizophrenia: overlap and difference with bipolar disorder. A study in naturalistically treated patients // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2010. – V. 13. – №. 10. – P. 1369-1381.
135. Craddock R. M., Lockstone H. E., Rider D. A., Wayland M. T., Harris L. J., McKenna P. J., Bahn S. Altered T-cell function in schizophrenia: a cellular model to investigate molecular disease mechanisms // *PloS One*. – 2007. – V. 2. – №. 8. – P. e692.
136. Ezeoke A., Mellor A., Buckley P., Miller B. A systematic, quantitative review of blood autoantibodies in schizophrenia // *Schizophrenia research*. – 2013. – V. 150. – №. 1. – P. 245-251.
137. Tomasik J., Rahmoune H., Guest P. C., Bahn S. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia // *Schizophrenia Research*. – 2016. – V. 176. – №. 1. – P. 3-13.
138. Whelan R., St Clair D., Mustard C. J., Hallford P., Wei J. Study of novel autoantibodies in schizophrenia // *Schizophrenia bulletin*. – 2018. – V. 44. – №. 6. – P. 1341-1349.
139. Deakin J., Lennox B. R., Zandi M. S. Antibodies to the N-methyl-D-aspartate receptor and other synaptic proteins in psychosis // *Biological psychiatry*. – 2014. – V. 75. – №. 4. – P. 284-291.
140. Pathmanandavel K., Starling J., Merheb V., Ramanathan S., Sinmaz N., Dale R. C., Brilot F. Antibodies to surface dopamine-2 receptor and N-methyl-D-aspartate receptor in the first episode of acute psychosis in children // *Biological psychiatry*. – 2015. – V. 77. – №. 6. – P. 537-547.
141. Borda T., Gomez R., Berría M. I., Sterin-Borda L. Antibodies against astrocyte M1 and M2 muscarinic cholinceptor from schizophrenic patients' sera // *Glia*. – 2004. – V. 45. – №. 2. – P. 144-154.
142. Van Berckel, B. N., Bossong M. G., Boellaard R., Kloet R., Schuitmaker A., Caspers E., Luurtsema G., Windhorst A. D., Cahn W., Lammertsma A. A., Kahn R. S. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C] PK11195 positron emission tomography study // *Biological psychiatry*. – 2008. – V. 64. – №. 9. – P. 820-822.
143. Monji, A., Kato T. A., Mizoguchi Y., Horikawa H., Seki Y., Kasai M., Yamauchi Y., Yamada S., Kanba S. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – V. 42. – P. 115-121.
144. Trepanier M. O., Hopperton K. E., Mizrahi R., Mechawar N., Bazinet R. P. Postmortem evidence of cerebral inflammation in schizophrenia: a systematic review // *Molecular psychiatry*. – 2016. – V. 21. – №. 8. – P. 1009-1026.
145. Fillman, S. G., Cloonan N., Catts V. S., Miller L. C., Wong J., McCrossin T., Cairns M., Weickert C. S. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia // *Molecular psychiatry*. – 2013. – V. 18. – №. 2. – P. 206-214.
146. Volk D. W., Moroco A. E., Roman K. M., Edelson J. R., Lewis D. A. The role of the nuclear factor- $\kappa$ B transcriptional complex in cortical immune activation in schizophrenia // *Biological psychiatry*. – 2019. – V. 85. – №. 1. – P. 25-34.
147. Hui C. W., St-Pierre A., El Hajj H., Remy Y., Hébert S. S., Luheshi G. N., Srivastava L. K., Tremblay M. È. Prenatal immune challenge in mice leads to partly sex-dependent behavioral, microglial, and molecular abnormalities associated with schizophrenia // *Frontiers in molecular neuroscience*. – 2018. – V. 11. – P. 13.

148. Bauman M. D., Iosif A. M., Smith S. E., Bregere C., Amaral D. G., Patterson P. H. Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring // *Biological psychiatry*. – 2014. – V. 75. – №. 4. – P. 332-341.
149. Meyer U. Developmental neuroinflammation and schizophrenia // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – V. 42. – P. 20-34.
150. Kneeland R. E., Fatemi S. H. Viral infection, inflammation and schizophrenia // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – V. 42. – P. 35-48.
151. Miller B. J., Culpepper N., Rapaport M. H., Buckley P. Prenatal inflammation and neurodevelopment in schizophrenia: a review of human studies // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2013. – V. 42. – P. 92-100.
152. Benros M. E., Nielsen P. R., Nordentoft M., Eaton W. W., Dalton S. O., Mortensen P. B. Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for schizophrenia: a 30-year population-based register study // *American Journal of Psychiatry*. – 2011. – V. 168. – №. 12. – P. 1303-1310.
153. Benros M. E., Mortensen P. B., Eaton W. W. Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2012. – V. 1262. – №. 1. – P. 56-66.
154. Feigenson K. A., Kusnecov A. W., Silverstein S. M. Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2014. – V. 38. – P. 72-93.
155. Nevinsky G.A, Buneva V.N. Natural catalytic antibodies – abzymes /Edited by Keinan E. Weinheim. – WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 2005.
156. Невинский Г. А., Канышкова Т. Г., Бунева В. Н. Природные каталитически активные антитела (абзимы) в норме и при патологии // *Биохимия*. – 2000. – Т. 65. – №. 11. – С. 1245-1255.
157. Невинский Г. А., Семенов Д. В., Бунева В. Н. Каталитически активные антитела (абзимы), индуцированные химически стабильными аналогами переходных состояний (обзор) // *Биохимия*. – 2000. – Т. 65. – №. 11. – С. 1459-1472.
158. Pauling L. Molecular architecture and biological reactions // *Chemical and engineering news*. – 1946. – V. 24. – №. 10. – P. 1375-1377.
159. Pauling L. Chemical achievement and hope for the future // *American Scientist*. – 1948. – V. 36. – №. 1. – P. 51.
160. Pauling L. Molecular basis of biological specificity // *Nature*. – 1974. – V. 248. – №. 5451. – P. 769-771.
161. Фершт, Э. Структура и механизм действия ферментов / Э. Фершт; Перевод с англ. Ю. Б. Гребенщикова. – М. : Мир, 1980. – 432 с.
162. Наградова Н. К. Каталитические антитела // *Соросовский образовательный журнал*. – 1996. – Т. 2. – №. 8. – С. 23-31.
163. Mader M. M., Bartlett P. A. Binding energy and catalysis: the implications for transition-state analogs and catalytic antibodies // *Chemical reviews*. – 1997. – V. 97. – №. 5. – P. 1281-1302.
164. Pauling L. Nature of forces between large molecules of biological interest // *Nature*. – 1948. – V. 161. – P. 707-709.
165. Jencks W. P. Catalysis in chemistry and enzymology / Jencks W. P.; Courier Corporation, McGraw-Hill, N. Y., 1987. – P. 1-806.
166. Pollack S. J., Jacobs J. W., Schultz P. G. Selective chemical catalysis by an antibody // *Science*. – 1986. – V. 234. – №. 4783. – P. 1570-1573.
167. Tramontano A., Janda K. D., Lerner R. A. Catalytic antibodies // *Science*. – 1986. – V. 234. – №. 4783. – P. 1566-1570.
168. Tramontano A., Janda K. D., Lerner R. A. Chemical reactivity at an antibody binding site elicited by mechanistic design of a synthetic antigen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1986. – V. 83. – №. 18. – P. 6736-6740.
169. Paul S., Volle D. J., Beach C. M., Johnson D. R., Powell M. J., Massey R. J. Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody // *Science*. – 1989. – V. 244. – №. 4909. – P. 1158-1162.
170. Slobin L. I. Preparation and some properties of antibodies with specificity toward p-nitrophenyl esters // *Biochemistry*. – 1966. – V. 5. – №. 9. – P. 2836-2844.
171. Кульберг А. Я., Дочева Ю. В., Тарханов И. А., Спивак В. А. О протеолитической активности в препаратах очищенного иммуноглобулина G и антител кролика // *Биохимия*. – 1969. – Т. 34. – №. 6. – С. 1178-1183.

- 
172. Abbas A. K., Lichtman A. H. H., Pillai S. Cellular and molecular immunology E-book. – Elsevier Health Sciences, 2014.
173. Collins A. M., Jackson K. J. L. On being the right size: antibody repertoire formation in the mouse and human // *Immunogenetics*. – 2018. – V. 70. – №. 3. – P. 143-158.
174. Saada R. et al. Models for antigen receptor gene rearrangement: CDR3 length // *Immunology and cell biology*. – 2007. – V. 85. – №. 4. – P. 323-332.
175. Paul S., Nishiyama Y., Planque, S., Taguchi H. Theory of proteolytic antibody occurrence // *Immunology letters*. – 2006. – V. 103. – №. 1. – P. 8-16.
176. Le Minoux D., Mahendra A., Kaveri S., Limnios N., Friboulet A., Avale B., Boquet D., Lacroix-Desmazes S., Padiolleau-Lefèvre S. A novel molecular analysis of genes encoding catalytic antibodies // *Molecular immunology*. – 2012. – V. 50. – №. 3. – P. 160-168.
177. Gao Q. S., Sun M., Rees A. R., Paul S. Site-directed mutagenesis of proteolytic antibody light chain // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – V. 253. – №. 5. – P. 658-664.
178. Gololobov G., Sun M., Paul S. Innate antibody catalysis // *Molecular immunology*. – 1999. – V. 36. – №. 18. – P. 1215-1222.
179. Planque S., Taguchi H., Burr G., Bhatia G., Karle S., Zhou Y. X., Nishiyama Y., Paul S. Broadly distributed chemical reactivity of natural antibodies expressed in coordination with specific antigen binding activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – №. 22. – P. 20436-20443.
180. Mitsuda Y., Hifumi E., Tsuruhata K., Fujinami H., Yamamoto N., Uda T. Catalytic antibody light chain capable of cleaving a chemokine receptor CCR-5 peptide with a high reaction rate constant // *Biotechnology and bioengineering*. – 2004. – V. 86. – №. 2. – P. 217-225.
181. Paul S. et al. Nature and nurture of catalytic antibodies // *Naturally Occurring Antibodies (NAbs)*. – Springer, New York, NY, 2012. – P. 56-75.
182. Sharma V., Heriot W., Trisler K., Smider V. Sharma V. et al. A human germ line antibody light chain with hydrolytic properties associated with multimerization status // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – V. 284. – №. 48. – P. 33079-33087.
183. Zhu, X., Tanaka F., Hu Y., Heine A., Fuller R., Zhong G., Olson A. J., Lerner R. A., Barbas C. F. 3rd, Wilson I. A. The origin of enantioselectivity in aldolase antibodies: crystal structure, site-directed mutagenesis, and computational analysis // *Journal of molecular biology*. – 2004. – V. 343. – №. 5. – P. 1269-1280.
184. Sapparapu G., Planque S., Mitsuda Y., McLean G., Nishiyama Y., Paul S. Constant domain-regulated antibody catalysis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – V. 287. – №. 43. – P. 36096-36104.
185. James L. C., Roversi P., Tawfik D. S. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity // *Science*. – 2003. – V. 299. – №. 5611. – P. 1362-1367.
186. Xie H., Vucetic S., Iakoucheva L. M., Oldfield C. J., Dunker A. K., Uversky V. N., Obradovic Z. Functional anthology of intrinsic disorder. 1. Biological processes and functions of proteins with long disordered regions // *Journal of proteome research*. – 2007. – V. 6. – №. 5. – P. 1882-1898.
187. Vucetic S., Xie H., Iakoucheva L. M., Oldfield C. J., Dunker A. K., Obradovic Z., Uversky V. N. Functional anthology of intrinsic disorder. 2. Cellular components, domains, technical terms, developmental processes, and coding sequence diversities correlated with long disordered regions // *Journal of proteome research*. – 2007. – V. 6. – №. 5. – P. 1899-1916.
188. Zouali M., Sarmay G. B lymphocyte signaling pathways in systemic autoimmunity: implications for pathogenesis and treatment // *Arthritis & Rheumatology*. – 2004. – V. 50. – №. 9. – P. 2730-2741.
189. Rawlings D. J., Metzler G., Wray-Dutra M., Jackson S. W. Altered B cell signalling in autoimmunity // *Nature reviews Immunology*. – 2017. – V. 17. – №. 7. – P. 421.
190. Tawfik D. S., Chap R., Green B. S., Sela M., Eshhar Z. Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: is there a linkage to autoimmunity? // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – V. 92. – №. 6. – P. 2145-2149.
191. Janda K. D., Shevlin C. G., Lerner R. A. Antibody catalysis of a disfavored chemical transformation // *Science*. – 1993. – V. 259. – №. 5094. – P. 490-493.
192. Wentworth P., Liu Y., Wentworth A. D., Fan P., Foley M. J., Janda K. D. A bait and switch hapten strategy generates catalytic antibodies for phosphodiester hydrolysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – V. 95. – №. 11. – P. 5971-5975.

193. Smiley J. A., Benkovic S. J. Selection of catalytic antibodies for a biosynthetic reaction from a combinatorial cDNA library by complementation of an auxotrophic *Escherichia coli*: antibodies for orotate decarboxylation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – V. 91. – №. 18. – P. 8319-8323.
194. Napper A. D., Benkovic S. J., Tramontano A., Lerner R. A. A stereospecific cyclization catalyzed by an antibody // *Science*. – 1987. – V. 237. – №. 4818. – P. 1041-1043.
195. Ding L., Liu Z., Zhu Z., Luo G., Zhao D., Ni J. Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic // *Biochemical Journal*. – 1998. – V. 332. – №. Pt 1. – P. 251.
196. Mahendra A., Sharma M., Rao D. N., Peyron I., Planchais C., Dimitrov J. D., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. Antibody-mediated catalysis: induction and therapeutic relevance // *Autoimmunity Reviews*. – 2013. – V. 12. – №. 6. – P. 648-652.
197. Iverson B. L., Lerner R. A. Sequence-specific peptide cleavage catalyzed by an antibody // *Science*. – 1989. – V. 243. – №. 4895. – P. 1184-1188.
198. Wirsching P., Ashley J. A., Lo C. H. L., Janda K. D., Lerner R. Reactive immunization // *Science*. – 1995. – V. 270. – №. 5243. – P. 1775-1783.
199. Paul S., Planque S., Zhou Y. X., Taguchi H., Bhatia G., Karle S., Hanson C., Nishiyama Y. Specific HIV gp120-cleaving antibodies induced by covalently reactive analog of gp120 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – №. 22. – P. 20429-20435.
200. Taguchi H., Planque S., Sapparapu G., Boivin S., Hara M., Nishiyama Y., Paul S. Exceptional amyloid  $\beta$  peptide hydrolyzing activity of nonphysiological immunoglobulin variable domain scaffolds // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – №. 52. – P. 36724-36733.
201. Jerne N. K. Towards a network theory of the immune system // *Ann. Immunol.* – 1974. – V. 125. – P. 373-389.
202. Izadyar L., Friboulet A., Remy M. H., Roseto A., Thomas D. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1993. – V. 90. – №. 19. – P. 8876-8880.
203. Avalle B., Thomas D., Friboulet A. Functional mimicry: elicitation of a monoclonal anti-idiotypic antibody hydrolyzing  $\beta$ -lactams // *The FASEB journal*. – 1998. – V. 12. – №. 11. – P. 1055-1060.
204. Hu R., Xie G. Y., Zhang X., Guo Z. Q., Jin S. Production and characterization of monoclonal anti-idiotypic antibody exhibiting a catalytic activity similar to carboxypeptidase A // *Journal of biotechnology*. – 1998. – V. 61. – №. 2. – P. 109-115.
205. Li J. W., Xia L., Su Y., Liu H., Xia X., Lu Q., Yang C., Reheman K. Molecular imprint of enzyme active site by camel nanobodies rapid and efficient approach to produce abzymes with alliinase activity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – V. 287. – №. 17. – P. 13713-13721.
206. Ponomarenko N. A., Pillet D., Paon M., Vorobiev I. I., Smirnov I. V., Adenier H., Avalle B., Kolesnikov A. V., Kozyr A. V., Thomas D., Gabibov A. G., Friboulet A. Anti-idiotypic antibody mimics proteolytic function of parent antigen // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46. – №. 50. – P. 14598-14609.
207. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Immunization of rabbits with DNase I produces polyclonal antibodies with DNase and RNase activities // *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*. – 2008. – V. 21. – №. 4. – P. 233-242.
208. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Immunization of rabbits with DNase II leads to formation of polyclonal antibodies with DNase and RNase activities // *International immunology*. – 2009. – V. 21. – №. 4. – P. 349-360.
209. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies against pancreatic ribonuclease A hydrolyze RNA and DNA // *International immunology*. – 2008. – V. 20. – №. 8. – P. 1031-1040.
210. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies against DNA hydrolyze DNA and RNA // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. – V. 73. – №. 11. – P. 1242-1253.
211. Krasnorutskii M. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies against RNA hydrolyze RNA and DNA // *Journal of Molecular Recognition*. – 2008. – V. 21. – №. 5. – P. 338-347.
212. Durova O. M., Vorobiev I. I., Smirnov I. V., Reshetnyak A. V., Telegin G. B., Shamborant O. G., Orlova N. A., Genkin D. D., Bacon A., Ponomarenko N. A., Friboulet A., Gabibov A. G. Strategies

- for induction of catalytic antibodies toward HIV-1 glycoprotein gp120 in autoimmune prone mice // *Molecular immunology*. – 2009. – V. 47. – №. 1. – P. 87-95.
213. Doronin V. B., Parkhomenko T. A., Korablev A., Toporkova L. B., Lopatnikova J. A., Alshevskaja A. A., Sennikov S. V., Buneva V. N., Budde T., Meuth S. G., Orlovskaya I. A., Popova N. A., Nevinsky G. A. Changes in different parameters, lymphocyte proliferation and hematopoietic progenitor colony formation in EAE mice treated with myelin oligodendrocyte glycoprotein // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2016. – V. 20. – №. 1. – P. 81-94.
214. Landry D. W., Zhao K., Yang G. X., Glickman M., Georgiadis T. M. Antibody-catalyzed degradation of cocaine // *Science*. – 1993. – V. 259. – №. 5103. – P. 1899-1901.
215. Uda T., Hifumi E. Super catalytic antibody and antigenase // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2004. – V. 97. – №. 3. – P. 143-152.
216. Lawrence D. A., McCabe Jr M. J. Immunomodulation by metals // *International Immunopharmacology*. – 2002. – V. 2. – №. 2-3. – P. 293-302.
217. Fournel S., Muller S. Anti-nucleosome antibodies and T-cell response in systemic lupus erythematosus // *Annales de medecine interne*. – 2002. – V. 153. – №. 8. – P. 513-519.
218. Bowen A., Wear M., Casadevall A. Antibody-mediated catalysis in infection and immunity // *Infection and immunity*. – 2017. – V. 85. – №. 9. – P. e00202-17.
219. Shuster A. M., Gololobov G. V., Kvashuk O. A., Bogomolova A. E., Smirnov I. V., Gabibov A. G. DNA hydrolyzing autoantibodies // *Science*. – 1992. – V. 256. – №. 5057. – P. 665-667.
220. Gabibov A. G., Gololobov G. V., Makarevich O. I., Schourov D. V., Chernova E. A., Yadav R. P. DNA-hydrolyzing autoantibodies // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 1994. – V. 47. – №. 2-3. – P. 293-303.
221. Andrievskaya O. A., Buneva V. N., Baranovskii A. G., Gal'vita A. V., Benzo E. S., Naumov V. A., Nevinsky G. A. Catalytic diversity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgG antibodies from the sera of patients with systemic lupus erythematosus // *Immunology letters*. – 2002. – V. 81. – №. 3. – P. 191-198.
222. Andrievskaya O. A., Buneva V. N., Naumov V. A., Nevinsky G. A. Catalytic heterogeneity of polyclonal RNA-hydrolyzing IgM from sera of patients with lupus erythematosus // *Medical Science Monitor*. – 2000. – V. 6. – №. 3. – P. 460-470.
223. Vlassov A., Florentz C., Helm M., Naumov V., Buneva V., Nevinsky G., Giegé R. Characterization and selectivity of catalytic antibodies from human serum with RNase activity // *Nucleic acids research*. – 1998. – V. 26. – №. 23. – P. 5243-5250.
224. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. IgGs containing light chains of the  $\lambda$ - and  $\kappa$ -type and of all subclasses (IgG1–IgG4) from the sera of patients with systemic lupus erythematosus hydrolyze myelin basic protein // *International immunology*. – 2012. – V. 24. – №. 12. – P. 759-770.
225. Magorivska I. B., Bilyy R. O., Havrylyuk A. M., Chop'yak V. V., Stoika R. S., Kit Y. Y. Anti-histone H1 IgGs from blood serum of systemic lupus erythematosus patients are capable of hydrolyzing histone H1 and myelin basic protein // *Journal of Molecular Recognition*. – 2010. – V. 23. – №. 5. – P. 495-502.
226. Bezuglova A. M., Dmitrenok P. S., Konenkova L. P., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Multiple sites of the cleavage of 17- and 19-mer encephalogenic oligopeptides corresponding to human myelin basic protein (MBP) by specific anti-MBP antibodies from patients with systemic lupus erythematosus // *Peptides*. – 2012. – V. 37. – №. 1. – P. 69-78.
227. Kulminskaya A. A., Saveliev A. N., Neustroev K. N. Human abzymes with amyolytic activity // *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. – 2004. – V. 16. – №. 87. – P. 17-31.
228. Барановский А. Г., Канышкова Т. Г., Могильницкий А. С., Наумов В. А., Бунева В. Н., Бойко А. Н., Заргарова Т. А., Фаворова О. О., Невинский Г. А. Поликлональные антитела из крови больных рассеянным склерозом эффективно гидролизуют РНК и ДНК // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63. – №. 10. – С. 1459.
229. Baranovskii A. G., Ershova N. A., Buneva V. N., Kanyshkova T. G., Mogelnitskii A. S., Doronin B. M., Boiko A. N., Gusev E. I., Favorova O. O., Nevinsky G. A. Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunology letters*. – 2001. – V. 76. – №. 3. – P. 163-167.
230. Барановский А. Г., Бунева В. Н., Доронин Б. М., Невинский Г. А. Иммуноглобулины крови больных рассеянным склерозом – каталитически гетерогенные нуклеазы // *Российский иммунологический журнал*. – 2008. – Т. 2. – №. 4. – С. 405-419.



231. Parkhomenko T. A., Legostaeva G. A., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A. IgGs containing light chains of the  $\lambda$  and  $\kappa$  type and of all subclasses (IgG1-IgG4) from sera of patients with multiple sclerosis hydrolyze DNA // *Journal of Molecular Recognition*. – 2010. – V. 23. – №. 5. – P. 486-494.
232. Parkhomenko T. A., Doronin V. B., Castellazzi M., Padroni M., Pastore M., Buneva V. N., Granieri E., Nevinsky G. A. Comparison of DNA-hydrolyzing antibodies from the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis // *PloS One*. – 2014. – V. 9. – №. 4. – P. e93001.
233. Ponomarenko N. A., Durova O. M., Vorobiev I. I., Belogurov A. A. Jr, Kurkova I. N., Petrenko A. G., Telegin G. B., Suchkov S. V., Kiselev S. L., Lagarkova M. A., Govorun V. M., Serebryakova M. V., Avalle B., Tornatore P., Karavanov A., Morse H. C. 3rd, Thomas D., Friboulet A., Gabibov A. G. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103. – №. 2. – P. 281-286.
234. Polosukhina D. I., Kanyshkova T. G., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Buneva V. N., Boiko A. N., Gusev E. I., Favorova O. O., Nevinsky G. A. Hydrolysis of myelin basic protein by polyclonal catalytic IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2004. – V. 8. – №. 3. – P. 359-368.
235. Polosukhina D. I., Buneva V. N., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Boiko A. N., Gusev E. I., Favorova O. O., Nevinsky G. A. Hydrolysis of myelin basic protein by IgM and IgA antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis // *Medical science monitor*. – 2005. – V. 11. – №. 8. – P. BR266-BR272.
236. Saveliev A. N., Ivanen D. R., Kulminskaya A. A., Ershova N. A., Kanyshkova T. G., Buneva V. N., Mogelnitskii A. S., Doronin B. M., Favorova O. O., Nevinsky G. A., Neustroev K. N. Amyolytic activity of IgM and IgG antibodies from patients with multiple sclerosis // *Immunology letters*. – 2003. – V. 86. – №. 3. – P. 291-297.
237. Taguchi H., Planque S., Nishiyama Y., Symersky J., Boivin S., Szabo P., Friedland R. P., Ramsland P. A., Edmundson A. B., Weksler M. E., Paul S. Autoantibody-catalyzed hydrolysis of amyloid  $\beta$  peptide // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – №. 8. – P. 4714-4722.
238. Li L., Paul S., Tyutyulkova S., Kazatchkine M. D., Kaveri S. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies // *The Journal of Immunology*. – 1995. – V. 154. – №. 7. – P. 3328-3332.
239. Nevinsky G. A., Breusov A. A., Baranovskii A. G., Prints A. V., Kanyshkova T. G., Galvita A. V., Naumov V. A., Buneva V. N. Effect of different drugs on the level of DNA-hydrolyzing polyclonal IgG antibodies in sera of patients with Hashimoto's thyroiditis and nontoxic nodal goiter // *Medical Science Monitor*. – 2001. – V. 7. – №. 2. – P. 201-211.
240. Kalaga R., Li L., O'Dell J. R., Paul S. Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis // *The Journal of Immunology*. – 1995. – V. 155. – №. 5. – P. 2695-2702.
241. Шустер А. М., Гололобов Г. Б., Квашук О. А., Габибов А. Г. Антиидиотипические и природные каталитически активные антитела // *Молекулярная биология*. – 1991. – Т. 25. – №. 3. – С. 593-602.
242. Wootla B., Dasgupta S., Dimitrov J. D., Bayry J., Lévesque H., Borg J. Y., Borel-Derlon A., Rao D. N., Friboulet A., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. Factor VIII hydrolysis mediated by anti-factor VIII autoantibodies in acquired hemophilia // *The Journal of Immunology*. – 2008. – V. 180. – №. 11. – P. 7714-7720.
243. Wootla B., Christophe O. D., Mahendra A., Dimitrov J. D., Repessé Y., Ollivier V., Friboulet A., Borel-Derlon A., Levesque H., Borg J. Y., Andre S., Bayry J., Calvez T., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. Proteolytic antibodies activate factor IX in patients with acquired hemophilia // *Blood*. – 2011. – V. 117. – №. 7. – P. 2257-2264.
244. Kundzer A. V., Volkova M. V., Bogdanos D. P., Rödiger S., Schierack P., Generalov I., Nevinsky G. A., Roggenbuck D. Deoxyribonuclease activity of polyclonal IgGs: a putative serological marker in patients with spondyloarthritis // *Immunologic research*. – 2013. – V. 56. – №. 2-3. – P. 457-464.
245. Власов А. В., Барановский А. Г., Канышкова Т. Г., Принц А. В., Забара В. Г., Наумов В. А., Бреусов А. А., Жьеже Р., Бунева В. Н., Невинский, Г. А. Субстратная специфичность ДНК- и РНК-гидролизующих антител из крови больных полиартритом и аутоиммунным тиреоидитом // *Молекулярная биология*. – 1998. – Т. 32. – №. 3. – С. 559-569.

246. Сучков С. В., Габибов А. Г. Введение в медицинскую абзимо-логию: состояние проблемы и перспективы // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2005. – №. 10. – С. 44-52.
247. Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Kaveri S. V., Hayon-Sonsino D., Thorenoor N., Charpentier J., Luyt C. E., Mira J. P., Nagaraja V., Kazatchkine M. D., Dhainaut J. F., Mallet V. O. High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – V. 102. – №. 11. – P. 4109-4113.
248. Одинцова Е. С., Харитоновна М. А., Барановский А. Г., Сизякина Л. П., Бунева В. Н., Невинский Г. А. ДНК-гидролизующие IgG-антитела из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – №. 5. – С. 857-864.
249. Одинцова Е. С., Харитоновна М. А., Барановский А. Г., Сизякина Л. П., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Протеолитическая активность IgG антител из крови больных синдромом приобретенного иммунодефицита человека // Биохимия. – 2006. – Т. 71. – №. 3. – С. 320-332.
250. Baranova S. V., Buneva V. N., Kharitonova M. A., Sizyakina L. P., Calmels C., Andreola M. L., Parissi V., Zakharova O. D., Nevinsky G. A. HIV-1 integrase-hydrolyzing IgM antibodies from sera of HIV-infected patients // International immunology. – 2010. – V. 22. – №. 8. – P. 671-680.
251. Odintsova E. S., Baranova S. V., Dmitrenok P. S., Rasskazov V. A., Calmels C., Parissi V., Andreola M. L., Buneva V. N., Zakharova O. D., Nevinsky G. A. Antibodies to HIV integrase catalyze site-specific degradation of their antigen // International immunology. – 2011. – V. 23. – №. 10. – P. 601-612.
252. Baranova S. V., Buneva V. N., Kharitonova M. A., Sizyakina L. P., Calmels C., Andreola M. L., Parissi V., Nevinsky G. A. HIV-1 integrase-hydrolyzing antibodies from sera of HIV-infected patients // Biochimie. – 2009. – V. 91. – №. 9. – P. 1081-1086.
253. Nevinsky G. A. Natural catalytic antibodies in norm and in HIV-infected patients // Understanding HIV/AIDS Management and Care-Pandemic Approaches in the 21st Century. – InTech, 2011.
254. Baranova S. V., Dmitrienok P. S., Ivanisenko N. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies to H1 histone from the sera of HIV-infected patients recognize and catalyze site-specific degradation of this histone // Journal of Molecular Recognition. – 2017. – V. 30. – №. 3.
255. Baranova S. V., Dmitrienok P. S., Ivanisenko N. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies to H2a and H2b histones from the sera of HIV-infected patients catalyze site-specific degradation of these histones // Molecular BioSystems. – 2017. – V. 13. – №. 6. – P. 1090-1101.
256. Baranova S. V., Dmitrenok P. S., Zubkova A. D., Ivanisenko N. V., Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky, G. A. Antibodies against H3 and H4 histones from the sera of HIV- infected patients catalyze site- specific degradation of these histones // Journal of Molecular Recognition. – 2018. – V. 31. – №. 7. – P. e2703.
257. Барановский А. Г., Матушин В. Г., Власов А. В. ДНК-и РНК-гидролизующие антитела из крови пациентов с различными формами вирусных гепатитов // Биохимия. – 1997. – Т. 62. – №. 12. – С. 1358-1366.
258. Parkhomenko T. A., Odintsova E. S., Buneva V. N., Kunder E. V., Zhylytsov I. V., Senkovich S. A., Generalov I. I., Nevinsky G. A. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with diseases caused by different bacterial infections // Journal of cellular and molecular medicine. – 2009. – V. 13. – №. 9a. – P. 2875-2887.
259. Bilyy R., Tomin A., Mahorivska I., Shalay O., Lohinsky V., Stoika R., Kit, Y. Antibody-mediated sialidase activity in blood serum of patients with multiple myeloma // Journal of Molecular Recognition. – 2011. – V. 24. – №. 4. – P. 576-584.
260. Matsuura K., Yamamoto K., Sinohara H. Amidase activity of human Bence Jones proteins // Biochemical and biophysical research communications. – 1994. – V. 204. – №. 1. – P. 57-62.
261. Thiagarajan P., Dannenbring R., Matsuura K., Tramontano A., Gololobov G., Paul S. Monoclonal antibody light chain with prothrombinase activity // Biochemistry. – 2000. – V. 39. – №. 21. – P. 6459-6465.
262. Kozyr A. V., Kolesnikov A. V., Aleksandrova E. S., Sashchenko L. P., Gnuchev N. V., Favorov P. V., Kotelnikov M. A., Iakhnina E. I., Astsaturov I. A., Prokaeva T. B., Alekberova Z. S., Suchkov S. V., Gabibov A. G. Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patients with lymphoproliferative and autoimmune diseases // Applied biochemistry and biotechnology. – 1998. – V. 75. – №. 1. – P. 45-61.

263. Lacroix-Desmazes S., Bayry J., Misra N., Horn M. P., Villard S., Pashov A., Stieltjes N., d'Oiron R., Saint-Remy J. M., Hoebeke J., Kazatchkine M. D., Reinbolt J., Mohanty D., Kaveri S. V. The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A // *New England Journal of Medicine*. – 2002. – V. 346. – №. 9. – P. 662-667.
264. Lacroix-Desmazes S., Moreau A., Sooryanarayana, Bonnemain C., Stieltjes N., Pashov A., Sultan Y., Hoebeke J., Kazatchkine M. D., Kaveri S. V. Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A // *Nature medicine*. – 1999. – V. 5. – №. 9. – P. 1044-1047.
265. Lacroix-Desmazes S., Wootla B., Dasgupta S., Delignat S., Bayry J., Reinbolt J., Hoebeke J., Saenko E., Kazatchkine M. D., Friboulet A., Christophe O., Nagaraja V., Kaveri S. V. Catalytic IgG from patients with hemophilia A inactivate therapeutic factor VIII // *The Journal of Immunology*. – 2006. – V. 177. – №. 2. – P. 1355-1363.
266. Wootla B., Nicoletti A., Patey N., Dimitrov J. D., Legendre C., Christophe O. D., Friboulet A., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S., Thauinat O. Hydrolysis of coagulation factors by circulating IgG is associated with a reduced risk for chronic allograft nephropathy in renal transplanted patients // *The Journal of Immunology*. – 2008. – V. 180. – №. 12. – P. 8455-8460.
267. Гальвита А. В., Барановский А. Г., Кузнецова И. А., Виншу Н. В., Галенок В. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Особенности гидролиза ДНК антителами из крови пациентов с сахарным диабетом // *Российский иммунологический журнал*. – 2007. – Т. 1. – №. 2. – С. 116-131.
268. Pagetta A., Tramentozzi E., Corbetti L., Frasson M., Brunati A. M., Finotti P. Characterization of immune complexes of idiotypic catalytic and anti-idiotypic inhibitory antibodies in plasma of type 1 diabetic subjects // *Molecular immunology*. – 2007. – V. 44. – №. 11. – P. 2870-2883.
269. Gonzalez-Gronow M., Cuchacovich M., Francos R., Cuchacovich S., Blanco A., Sandoval R., Gomez C. F., Valenzuela J. A., Ray R., Pizzo S. V. Catalytic autoantibodies against myelin basic protein (MBP) isolated from serum of autistic children impair in vitro models of synaptic plasticity in rat hippocampus // *Journal of neuroimmunology*. – 2015. – V. 287. – P. 1-8.
270. Kanyshkova T. G., Semenov D. V., Khlimankov D. Y., Buneva V. N., Nevinsky G. A. DNA-hydrolyzing activity of the light chain of IgG antibodies from milk of healthy human mothers // *FEBS letters*. – 1997. – V. 416. – №. 1. – P. 23-26.
271. Nevinsky G. A., Kanyshkova T. G., Semenov D. V., Vlassov A. V., Gal'vita A. V., Buneva V. N. Secretory immunoglobulin A from healthy human mothers' milk catalyzes nucleic acid hydrolysis // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2000. – V. 83. – №. 1-3. – P. 115-130.
272. Savel'ev A. N., Kanyshkova T. G., Kulminskaya A. A., Buneva V. N., Eneyskaya E. V., Filatov M. V., Nevinsky G. A., Neustroev K. N. Amylolytic activity of IgG and sIgA immunoglobulins from human milk // *Clinica chimica acta*. – 2001. – V. 314. – №. 1-2. – P. 141-152.
273. Semenov D. V., Kanyshkova T. G., Karotaeva N. A., Krasnorutskii M. A., Kuznetsova I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Catalytic nucleotide-hydrolyzing antibodies in milk and serum of clinically healthy human mothers // *Medical Science Monitor*. – 2004. – V. 10. – №. 2. – P. BR23-BR33.
274. Бунева В. Н., Кудрявцева А. Н., Гальвита А. В., Дубровская В. В., Хохлова О. В., Калинина И. А., Галенок В. А., Невинский, Г. А. Динамика уровня нуклеазной активности антител крови женщины во время беременности и лактации // *Биохимия*. – 2003. – Т. 68. – №. 8. – С. 1088-1100.
275. Odintsova E. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Casein-hydrolyzing activity of sIgA antibodies from human milk // *Journal of Molecular Recognition*. – 2005. – V. 18. – №. 5. – P. 413-421.
276. Barrera G. J., Portillo R., Mijares A., Rocafull M. A., del Castillo J. R., Thomas L. E. Immunoglobulin A with protease activity secreted in human milk activates PAR-2 receptors, of intestinal epithelial cells HT-29, and promotes beta-defensin-2 expression // *Immunology letters*. – 2009. – V. 123. – №. 1. – P. 52-59.
277. Nevinsky G. A., Kit Y. Ya., Semenov D. V., Khlimankov D. Yu., Buneva V. N. Secretory immunoglobulin A from human milk catalyzes milk protein phosphorylation // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 1998. – V. 75. – №. 1. – P. 77.
278. Gorbunov D. V., Karataeva N. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Lipid kinase activity of antibodies from milk of clinically healthy human mothers // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. – 2005. – V. 1735. – №. 3. – P. 153-166.
279. Karataeva N. A., Gorbunov D., Prokudin I. V., Buneva V. N., Kulminskaya A. A., Neustroev K. N., Nevinsky G. A. Human milk antibodies with polysaccharide kinase activity // *Immunology letters*. – 2006. – V. 103. – №. 1. – P. 58-67.

280. Mitsuda Y., Planque S., Hara M., Kyle R., Taguchi H., Nishiyama Y., Paul S. Naturally occurring catalytic antibodies: evidence for preferred development of the catalytic function in IgA class antibodies // *Molecular biotechnology*. – 2007. – V. 36. – №. 2. – P. 113-122.
281. Paul S., Karle S., Planque S., Taguchi H., Salas M., Nishiyama Y., Handy B., Hunter R., Edmundson A., Hanson C. Naturally occurring proteolytic antibodies selective immunoglobulin M-catalyzed hydrolysis of HIV gp120 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – №. 38. – P. 39611-39619.
282. Planque S., Mitsuda Y., Taguchi H., Salas M., Morris M. K., Nishiyama Y., Kyle R., Okhuysen P., Escobar M., Hunter R., Sheppard H. W., Hanson C., Paul S. Characterization of gp120 hydrolysis by IgA antibodies from humans without HIV infection // *AIDS research and human retroviruses*. – 2007. – V. 23. – №. 12. – P. 1541-1554.
283. Planque S., Nishiyama Y., Taguchi H., Salas M., Hanson C., Paul S. Catalytic antibodies to HIV: physiological role and potential clinical utility // *Autoimmunity reviews*. – 2008. – V. 7. – №. 6. – P. 473-479.
284. Planque S. A., Nishiyama Y., Hara M., Sonoda S., Murphy S. K., Watanabe K., Mitsuda Y., Brown E. L., Massey R. J., Primmer S. R., O'Nuallain B., Paul S. Physiological IgM class catalytic antibodies selective for transthyretin amyloid // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V. 289. – №. 19. – P. 13243-13258.
285. Brown E. L., Nishiyama Y., Dunkle J. W., Aggarwal S., Planque S., Watanabe K., Csencsits-Smith K., Bowden M. G., Kaplan S. L., Paul S. Constitutive production of catalytic antibodies to a *Staphylococcus aureus* virulence factor and effect of infection // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – V. 287. – №. 13. – P. 9940-9951.
286. 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 // *Journal of Molecular Recognition*. – 2015. – V. 28. – №. 9. – P. 565-580.
287. Tolmacheva A. S., Ermakov E. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Substrate specificity of healthy human sera IgG antibodies with peroxidase and oxydoreductase activities // *Royal Society open science*. – 2018. – V. 5. – №. 1. – P. 171097.
288. Бунева В. Н., Невинский Г. А. Исключительное многообразие каталитических антител с различными активностями в крови пациентов с аутоиммунными и вирусными заболеваниями // *Молекулярная биология*. – 2017. – Т. 51. – №. 6. – С. 969-984.
289. Planque S., Bangale Y., Song X. T., Karle S., Taguchi H., Poindexter B., Bick R., Edmundson A., Nishiyama Y., Paul S. Ontogeny of proteolytic immunity: IgM serine proteases // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – №. 14. – P. 14024-14032.
290. Mitsuda Y., Planque S., Hara M., Kyle R., Taguchi H., Nishiyama Y., Paul S. Naturally occurring catalytic antibodies: evidence for preferred development of the catalytic function in IgA class antibodies // *Molecular biotechnology*. – 2007. – V. 36. – №. 2. – P. 113-122.
291. Andryushkova A. A., Kuznetsova I. A., Bineva V. N., Toporkova L. B., Sakhno L. V., Tikhonova M. A., Chernykh E. R., Orlovskaya I. A., Nevinsky G. A. Formation of different abzymes in autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice is associated with changes in colony formation of haematopoietic progenitors // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2007. – V. 11. – №. 3. – P. 531-551.
292. 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 // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2020. – V. 2020. – Article № 8171020.
293. Parshukova D., Smirnova L. P., Ermakov E. A., Bokhan N. A., Semke A. V., Ivanova S. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Autoimmunity and immune system dysregulation in schizophrenia: IgGs from sera of patients hydrolyze myelin basic protein // *Journal of Molecular Recognition*. – 2019. – V. 32. – №. 2. – P. e2759.
294. Parshukova D. A., Smirnova L. P., Kornetova E. G., Semke A. V., Buneva V. N., Ivanova S. A. Igg-Dependent Hydrolysis of Myelin Basic Protein of Patients with Different Courses of Schizophrenia // *Journal of Immunology Research*. – 2020. – V. 2020. – Article № 8986521.
295. Paul S. Mechanism and functional role of antibody catalysis // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 1998. – V. 75. – №. 1. – P. 13-24.
296. Kozyr A. V., Sashchenko L. P., Kolesnikov A. V., Zelenova N. A., Khaidukov S. V., Ignatova A. N., Bobik T. V., Gabibov A. G., Alekberova Z. S., Suchkov S. V., Gnuchev N. V. Anti-DNA

- autoantibodies reveal toxicity to tumor cell lines // *Immunology letters*. – 2002. – V. 80. – №. 1. – P. 41-47.
297. Lee E. J., Jang E. J., Lee E., Yu J., Chung H. Y., Jang Y. J. Cell-penetrating autoantibody induces caspase-mediated apoptosis through catalytic hydrolysis of DNA // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2007. – V. 15. – №. 5. – P. 2016-2023.
298. Jang, J. Y., Jeong J. G., Jun H. R., Lee S. C., Kim J. S., Kim Y. S., Kwon M. H. A nucleic acid-hydrolyzing antibody penetrates into cells via caveolae-mediated endocytosis, localizes in the cytosol and exhibits cytotoxicity // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2009. – V. 66. – №. 11-12. – P. 1985-1997.
299. Lee G., Yu J., Cho S., Byun S. J., Kim D. H., Lee T. K., Kwon M. H., Lee S. A nucleic-acid hydrolyzing single chain antibody confers resistance to DNA virus infection in hela cells and C57BL/6 mice // *PLoS Pathogens*. – 2014. – V. 10. – №. 6. – P. e1004208.
300. Weisbart R. H., Gera J. F., Chan G., Hansen J. E., Li E., Cloninger C., Levine A. J., Nishimura R. N. A cell-penetrating bispecific antibody for therapeutic regulation of intracellular targets // *Molecular cancer therapeutics*. – 2012. – V. 11. – №. 10. – P. 2169-2173.
301. Belogurov A. Jr, Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. Catalytic antibodies: balancing between Dr. Jekyll and Mr. Hyde // *Bioessays*. – 2009. – V. 31. – №. 11. – P. 1161-1171.
302. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Natural catalytic antibodies in norm, autoimmune, viral, and bacterial diseases // *The Scientific World Journal*. – 2010. – V. 10. – Article №. 820417.
303. Sigounas G., Harindranath N., Donadel G., Notkins A. L. Half-life of polyreactive antibodies // *Journal of clinical immunology*. – 1994. – V. 14. – №. 2. – P. 134-140.
304. Padiolleau-Lefèvre S., Naya R. B., Shamsavarian M. A., Friboulet A., Avelle B. Catalytic antibodies and their applications in biotechnology: state of the art // *Biotechnology letters*. – 2014. – V. 36. – №. 7. – P. 1369-1379.
305. Mahendra A., Sharma M., Rao D. N., Peyron I., Planchais C., Dimitrov J. D., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. Antibody-mediated catalysis: induction and therapeutic relevance // *Autoimmunity Reviews*. – 2013. – V. 12. – №. 6. – P. 648-652.
306. Hanson C. V., Nishiyama Y., Paul S. Catalytic antibodies and their applications // *Current opinion in biotechnology*. – 2005. – V. 16. – №. 6. – P. 631-636.
307. Smirnov I., Carletti E., Kurkova I., Nachon F., Nicolet Y., Mitkevich V. A., Débat H., Avelle B., Belogurov A. A. Jr, Kuznetsov N., Reshetnyak A., Masson P., Tonevitsky A. G., Ponomarenko N., Makarov A. A., Friboulet A., Tramontano A., Gabibov A. Reactibodies generated by kinetic selection couple chemical reactivity with favorable protein dynamics // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – V. 108. – №. 38. – P. 15954-15959.
308. Smirnov I. V., Golovin A. V., Chatziefthimiou S. D., Stepanova A. V., Peng Y., Zolotareva O. I., Belogurov A. A. Jr, Kurkova I. N., Ponomarenko N. A., Wilmanns M., Blackburn G. M., Gabibov A. G., Lerner R. A. Robotic QM/MM-driven maturation of antibody combining sites // *Science advances*. – 2016. – V. 2. – №. 10. – P. e1501695.
309. Bowen A., Wear M. P., Cordero R., Oscarson S., Casadevall A. A monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan manifests hydrolytic activity for both peptides and polysaccharides // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – V. 292. – №. 2. – P. 417-434.
310. Fukuchi K. I., Yang J., Kou J., Song M., Lalonde R., Planque S. A., Paul S. Prophylactic and Therapeutic Applications of Catalytic Immunoglobulin Gene Delivery in a Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Gene Therapy in Neurological Disorders*. – Academic Press, 2018. – P. 139-161.
311. Lee W. R., Jang J. Y., Kim J. S., Kwon M. H., Kim Y. S. Gene silencing by cell-penetrating, sequence-selective and nucleic-acid hydrolyzing antibodies // *Nucleic acids research*. – 2010. – V. 38. – №. 5. – P. 1596-1609.
312. Kay S. R., Fiszbein A., Opler L. A. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia // *Schizophrenia bulletin*. – 1987. – V. 13. – №. 2. – P. 261-276.
313. Bezuglova A. M., Konenkova L. P., Doronin B. M., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Affinity and catalytic heterogeneity and metal-dependence of polyclonal myelin basic protein-hydrolyzing IgGs from sera of patients with systemic lupus erythematosus // *Journal of Molecular Recognition*. – 2011. – V. 24. – №. 6. – P. 960-974.
314. Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein // *Protein science*. – 1995. – V. 4. – №. 11. – P. 2411-2423.

- 
315. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – №. 5259. – P. 680.
316. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. – New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
317. Morrissey J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity // *Anal. Biochem.* – 1981. – V. 117. – P. 307-310.
318. Parkhomenko T. A., Buneva V. N., Tyshkevich O. B., Generalov I. I., Doronin B. M., Nevinsky G. A. DNA-hydrolyzing activity of IgG antibodies from the sera of patients with tick-borne encephalitis // *Biochimie*. – 2010. – V. 92. – №. 5. – P. 545-554.
319. Aebi H. [13] Catalase in vitro // *Methods in enzymology*. – Academic Press, 1984. – T. 105. – C. 121-126.
320. Beers R. F., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1952. – V. 195. – №. 1. – P. 133-140.
321. Fersht A. *Enzyme Structure and Mechanism*. – NY: W.H. Freeman, 1985.
322. Lineweaver H., Burk D. The determination of enzyme dissociation constants // *Journal of the American chemical society*. – 1934. – V. 56. – №. 3. – P. 658-666.
323. Andryushkova A. A., Kuznetsova I. A., Orlovskaya I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies with amylase activity from the sera of autoimmune-prone MRL/MpJ-lpr mice // *FEBS letters*. – 2006. – V. 580. – №. 21. – P. 5089-5095.
324. Andryushkova A. A., Kuznetsova I. A., Orlovskaya I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Nucleotide-hydrolyzing antibodies from the sera of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice // *International immunology*. – 2009. – V. 21. – №. 8. – P. 935-945.
325. Fisher B. M., Grilley J. E., Raines R. T. A new remote subsite in ribonuclease A // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – №. 51. – P. 34134-34138.
326. Crook E. M., Mathias A. P., Rabin B. R. Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2': 3'-phosphate // *Biochemical Journal*. – 1960. – V. 74. – №. 2. – P. 234.
327. Irie M., Mikami F., Monma K., Ohgi K., Watanabe H., Yamaguchi R., Nagase H. Kinetic studies on the cleavage of oligouridylic acids and poly U by bovine pancreatic ribonuclease A // *The Journal of Biochemistry*. – 1984. – V. 96. – №. 1. – P. 89-96.
328. Voet D., Gratzer W. B., Cox R. A., Doty P. Absorption spectra of nucleotides, polynucleotides, and nucleic acids in the far ultraviolet // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 1963. – V. 1. – №. 3. – P. 193-208.
329. Reuter J. S., Mathews D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis // *BMC bioinformatics*. – 2010. – V. 11. – №. 1. – P. 1-9.
330. Magnus M. et al. SimRNAweb: a web server for RNA 3D structure modeling with optional restraints // *Nucleic acids research*. – 2016. – V. 44. – №. W1. – P. W315-W319.
331. Huhn C., Selman M. H., Ruhaak L. R., Deelder A. M., Wuhler M. IgG glycosylation analysis // *Proteomics*. – 2009. – V. 9. – №. 4. – P. 882-913.
332. Sepiashvili L., Kohlhagen M. C., Snyder M. R., Willrich M. A., Mills J. R., Dispenzieri A., Murray D. L. Direct detection of monoclonal free light chains in serum by use of immunoenrichment-coupled MALDI-TOF mass spectrometry // *Clinical chemistry*. – 2019. – V. 65. – №. 8. – P. 1015-1022.
333. Wang W., Singh S., Zeng D. L., King K., Nema S. Antibody structure, instability, and formulation // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2007. – V. 96. – №. 1. – P. 1-26.
334. Rock E. P., Sibbald P. R., Davis M. M., Chien Y. H. CDR3 length in antigen-specific immune receptors // *Journal of Experimental Medicine*. – 1994. – V. 179. – №. 1. – P. 323-328.
335. Bridges S. L., Lee S. K., Johnson M. L., Lavelle J. C., Fowler P. G., Koopman W. J., Schroeder H. W. Somatic mutation and CDR3 lengths of immunoglobulin kappa light chains expressed in patients with rheumatoid arthritis and in normal individuals // *The Journal of clinical investigation*. – 1995. – V. 96. – №. 2. – P. 831-841.
336. Tiumentseva M., Morozova V., Zakabunin A., Korobko D., Malkova N., Filipenko M., Tikunova N. Use of the V H 6-1 gene segment to code for anti-interleukin-18 autoantibodies in multiple sclerosis // *Immunogenetics*. – 2016. – V. 68. – №. 4. – P. 237-246.

337. Plomp R., Ruhaak L. R., Uh H. W., Reiding K. R., Selman M., Houwing-Duistermaat J. J., Slagboom P. E., Beekman M., Wuhler M. Subclass-specific IgG glycosylation is associated with markers of inflammation and metabolic health // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 12325.
338. Parekh R. B., Dwek R. A., Sutton B. J., Fernandes D. L., Leung A., Stanworth D., Rademacher T. W., Mizuochi T., Taniguchi T., Matsuta K., Takeuchi F., Nagano Y., Miyamoto T., Kobata A. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG // *Nature*. – 1985. – V. 316. – №. 6027. – P. 452–457.
339. Preud'homme J. L., Aucouturier P., Touchard G., Striker L., Khamlichi A. A., Rocca A., Denoroy L., Cogné M. Monoclonal immunoglobulin deposition disease (Randall type). Relationship with structural abnormalities of immunoglobulin chains // *Kidney international*. – 1994. – V. 46. – №. 4. – P. 965-972.
340. Buxbaum J. Aberrant immunoglobulin synthesis in light chain amyloidosis. Free light chain and light chain fragment production by human bone marrow cells in short-term tissue culture // *The Journal of clinical investigation*. – 1986. – V. 78. – №. 3. – P. 798-806.
341. Tolmacheva A. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Substrate specificity of IgGs with peroxidase and oxidoreductase activities from sera of patients with systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis // *Journal of Molecular Recognition*. – 2019. – V. 32. – №. 12. – P. e2807.
342. Ikhmyangan E. N., Vasilenko N. L., Buneva V. N., Nevinsky G. A. IgG antibodies with peroxidase-like activity from the sera of healthy Wistar rats // *FEBS letters*. – 2005. – V. 579. – №. 18. – P. 3960-3964.
343. Ikhmyangan E. N., Vasilenko N. L., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Metal ions-dependent peroxidase and oxidoreductase activities of polyclonal IgGs from the sera of Wistar rats // *Journal of Molecular Recognition*. – 2006. – V. 19. – №. 2. – P. 91-105.
344. Tolmacheva A. S., Zaksas N. P., Buneva V. N., Vasilenko N. L., Nevinsky G. A. Oxidoreductase activities of polyclonal IgGs from the sera of Wistar rats are better activated by combinations of different metal ions // *Journal of Molecular Recognition*. – 2009. – V. 22. – №. 1. – P. 26-37.
345. O'Brien P. J. Peroxidases // *Chemico-biological interactions*. – 2000. – V. 129. – №. 1-2. – P. 113-139.
346. Ricoux R., Sauriat-Dorizon H., Girgenti E., Blanchard D., Mahy J. P. Hemoabzymes: towards new biocatalysts for selective oxidations // *Journal of immunological methods*. – 2002. – V. 269. – №. 1-2. – P. 39-57.
347. Dimitrov J. D., Roumenina L. T., Doltchinkova V. R., Mihaylova N. M., Lacroix-Desmazes S., Kaveri S. V., Vassilev T. L. Antibodies use heme as a cofactor to extend their pathogen elimination activity and to acquire new effector functions // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V. 282. – №. 37. – P. 26696-26706.
348. Hadzhieva M., Vassilev T. L., Roumenina L. T., Bayry J., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S., Dimitrov J. D. Mechanism and functional implications of the heme-induced binding promiscuity of IgE // *Biochemistry*. – 2015. – V. 54. – №. 11. – P. 2061-2072.
349. Božinović N., Ajdačić V., Lazic J., Lecerf M., Davenport V., Nikodinovic-Runic J., Opsenica I. M., Dimitrov J. D. Aromatic Guanyldrazones for the Control of Heme-Induced Antibody Polyreactivity // *ACS Omega*. – 2019. – V. 4. – №. 24. – P. 20450-20458.
350. Todorova-Balvay D., Pitiot O., Bourhim M., Srikrishnan T., Vijayalakshmi M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments // *Journal of chromatography B*. – 2004. – V. 808. – №. 1. – P. 57-62.
351. Wentworth A. D., Jones L. H., Wentworth P. Jr, Janda K. D., Lerner R. A. Antibodies have the intrinsic capacity to destroy antigens // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – V. 97. – №. 20. – P. 10930-10935.
352. Wentworth P. Jr, Jones L. H., Wentworth A. D., Zhu X., Larsen N. A., Wilson I. A., Xu X., Goddard W. A. 3rd, Janda K. D., Eschenmoser A., Lerner R. A. Antibody catalysis of the oxidation of water // *Science*. – 2001. – V. 293. – №. 5536. – P. 1806-1811.
353. Wentworth P. Jr, McDunn J. E., Wentworth A. D., Takeuchi C., Nieva J., Jones T., Bautista C., Ruedi J. M., Gutierrez A., Janda K. D., Babior B. M., Eschenmoser A., Lerner R. A. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation // *Science*. – 2002. – V. 298. – №. 5601. – P. 2195-2199.

354. Wentworth P., Witter D. P. Antibody-catalyzed water-oxidation pathway // *Pure and Applied Chemistry*. – 2008. – V. 80. – №. 8. – P. 1849-1858.
355. Goyal M. M., Basak A. Human catalase: looking for complete identity // *Protein & cell*. – 2010. – V. 1. – №. 10. – P. 888-897.
356. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation // *Nature immunology*. – 2002. – V. 3. – №. 12. – P. 1129-1134.
357. Ткачук В. А., Тюрин-Кузьмин П. А., Белоусов В. В., Воротников А. В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник // *Биологические мембраны*. – 2012. – Т. 29. – №. 1-2. – С. 21-37.
358. Rhee S. G., Chang T. S., Bae Y. S., Lee S. R., Kang S. W. Cellular regulation by hydrogen peroxide // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2003. – V. 14. – №. suppl 3. – P. S211-S215.
359. Bienert G. P., Møller A. L., Kristiansen K. A., Schulz A., Møller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V. 282. – №. 2. – P. 1183-1192.
360. Oswald M. C. W., Garnham N., Sweeney S. T., Landgraf M. Regulation of neuronal development and function by ROS // *FEBS letters*. – 2018. – V. 592. – №. 5. – P. 679-691.
361. Ghadermarzi M., Moosavi-Movahedi A. A. Determination of the kinetic parameters for the “suicide substrate” inactivation of bovine liver catalase by hydrogen peroxide // *Journal of enzyme inhibition*. – 1996. – V. 10. – №. 3. – P. 167-175.
362. Vermeer A. W. P., Norde W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein // *Biophysical journal*. – 2000. – V. 78. – №. 1. – P. 394-404.
363. Feinstein R. N., Sacher G. A., Howard J. B., Braun J. T. Comparative heat stability of blood catalase // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1967. – V. 122. – №. 2. – P. 338-343.
364. Ихмянган Э. Н., Василенко Н. Л., Синицина О. И., Бунева В. Н., Невинский Г. А. Каталитическая гетерогенность иммуноглобулинов класса G с пероксидазной активностью, выделенных из крови здоровых крыс Wistar // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. – 2006. – №. 2. – С. 32-48.
365. Lousada C. M., Yang M., Nilsson K., Jonsson M. Catalytic decomposition of hydrogen peroxide on transition metal and lanthanide oxides // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. – 2013. – V. 379. – P. 178-184.
366. Forman H. J., Fridovich I. On the stability of bovine superoxide dismutase // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1973. – V. 248. – №. 8. – P. 2645-2649.
367. Tainer J. A., Getzoff E. D., Richardson J. S., Richardson D. C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase // *Nature*. – 1983. – V. 306. – №. 5940. – P. 284-287.
368. Drum D. E., Vallee B. L. Differential chemical reactivities of zinc in horse liver alcohol dehydrogenase // *Biochemistry*. – 1970. – V. 9. – №. 21. – P. 4078-4086.
369. Yamada K. Cobalt: its role in health and disease // *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*. – Springer, Dordrecht, 2013. – P. 295-320.
370. Charef N., Arrar L., Lamaoui A., Boudjellal H., Baghiani A., Hanachi N., Boumerfeg S., Khennouf S., Mubarak M. S. Effect of adsorbed metal ions and buffer nature on IgG separation from human plasma by column chromatography using an ion exchange resin, Amberlite IRC-718 // *Journal of applied polymer science*. – 2010. – V. 115. – №. 1. – P. 324-329.
371. Gutierrez R., Martín del Valle E. M., Galan M. A. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends // *Separation & Purification Reviews*. – 2007. – V. 36. – №. 1. – P. 71-111.
372. Polosukhina D. I., Kanyshkova T. G., Doronin B. M., Tyshkevich O. B., Buneva V. N., Boiko A. N., Gusev E. I., Nevinsky G. A., Favorova O. O. Metal-dependent hydrolysis of myelin basic protein by IgGs from the sera of patients with multiple sclerosis // *Immunology letters*. – 2006. – V. 103. – №. 1. – P. 75-81.
373. Zaksas N. P., Nevinsky G. A. Minor and Trace Elements in Whole Blood, Tissues, Proteins and Immunoglobulins of Mammals // *Trace Elements: Human Health and Environment*; IntechOpen – 2018. – P. 11-44.
374. Ogura Y., Yamazaki I. Steady-state kinetics of the catalase reaction in the presence of cyanide // *The Journal of Biochemistry*. – 1983. – V. 94. – №. 2. – P. 403-408.



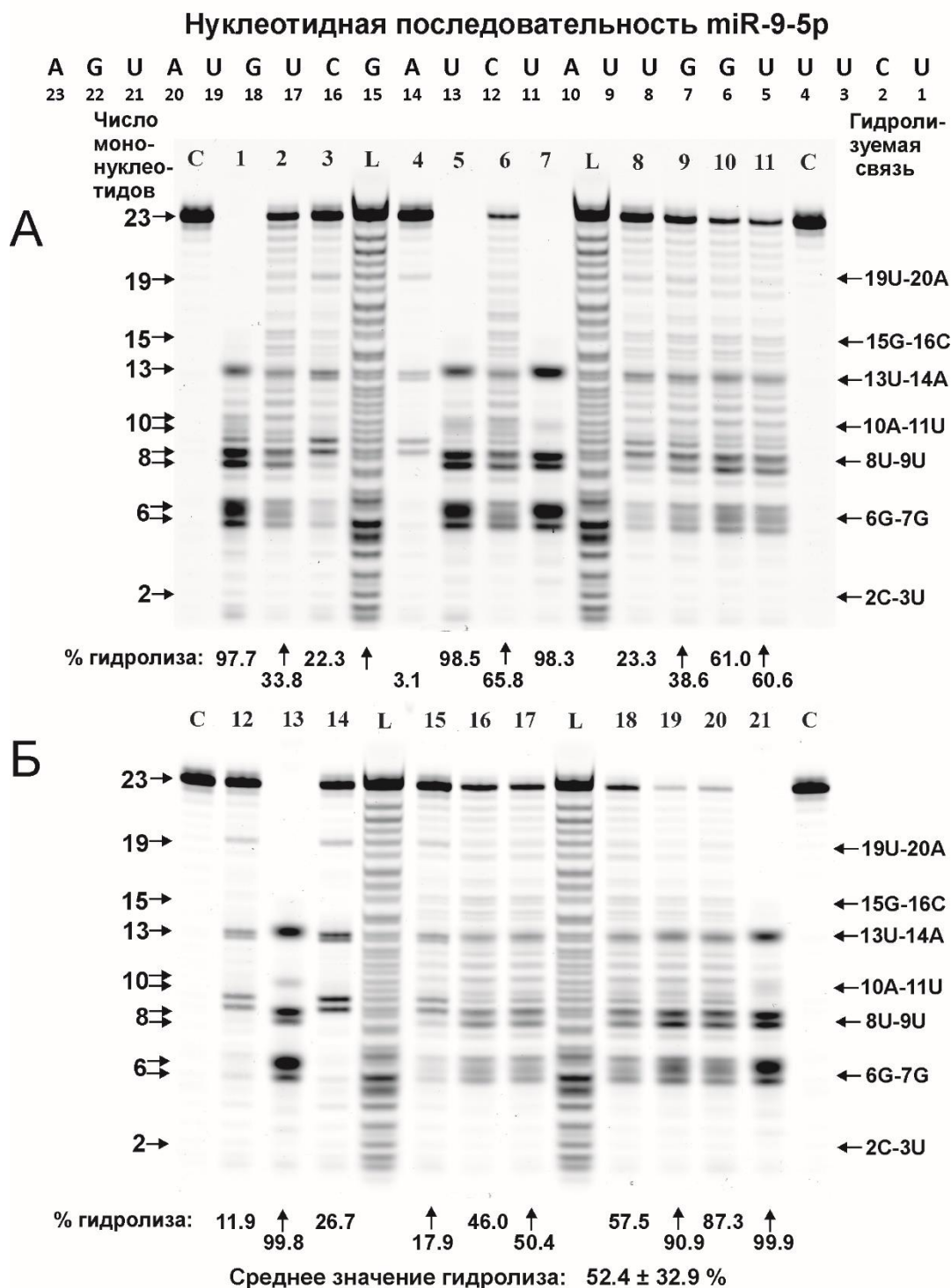
375. Switala J., Loewen P. C. Diversity of properties among catalases // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2002. – V. 401. – №. 2. – P. 145-154.
376. Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G. The fenton reagents // *Free radical biology and medicine*. – 1993. – V. 15. – №. 4. – P. 435-445.
377. Liu H., May K. Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function // *MAbs*. – 2012. – V. 4. – №. 1. – P. 17-23.
378. Trujillo M., Alvarez B., Radi R. One-and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates // *Free radical research*. – 2016. – V. 50. – №. 2. – P. 150-171.
379. Rhee S. G., Kil I. S. Multiple functions and regulation of mammalian peroxiredoxins // *Annual review of biochemistry*. – 2017. – V. 86. – P. 749-775.
380. Agar N. S., Sadrzadeh S. M., Hallaway P. E., Eaton J. W. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? // *The Journal of clinical investigation*. – 1986. – V. 77. – №. 1. – P. 319-321.
381. Andryushkova A. A., Kuznetsova I. A., Orlovskaya I. A., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies with amylase activity from the sera of autoimmune-prone MRL/MpJ-lpr mice // *FEBS letters*. – 2006. – V. 580. – №. 21. – P. 5089-5095.
382. Di Virgilio F., Sarti A. C., Coutinho-Silva R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2020. – V. 318. – №. 5. – P. C832-C835.
383. Denning N. L., Aziz M., Gurien S. D., Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 2536.
384. Ratajczak M. Z., Pedziwiatr D., Cymer M., Kucia M., Kucharska-Mazur J., Samochowiec J. Sterile inflammation of brain, due to activation of innate immunity, as a culprit in psychiatric disorders // *Frontiers in psychiatry*. – 2018. – V. 9. – P. 60.
385. Gong T., Liu L., Jiang W., Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases // *Nature Reviews Immunology*. – 2019. – P. 1-18.
386. Cauwels A., Rogge E., Vandendriessche B., Shiva S., Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality // *Cell death & disease*. – 2014. – V. 5. – №. 3. – P. e1102-e1102.
387. Брызгунова О. Е., Лактионов П. П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции // *Биомедицинская химия*. – 2015. – Т. 61. – №. 4. – С. 409-426.
388. Aucamp J., Bronkhorst A. J., Badenhorst C. P., Pretorius P. J. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature // *Biological Reviews*. – 2018. – V. 93. – №. 3. – P. 1649-1683.
389. Jiang J., Chen X., Sun L., Qing Y., Yang X., Hu X., Yang C., Xu T., Wang J., Wang P., He L., Dong C., Wan C. Analysis of the concentrations and size distributions of cell-free DNA in schizophrenia using fluorescence correlation spectroscopy // *Translational psychiatry*. – 2018. – V. 8. – Article №. 104.
390. Ershova E. S., Jestkova E. M., Martynov A. V., Shmarina G. V., Umriukhin P. E., Bravve L. V., Zakharova N. V., Kostyuk G. P., Saveliev D. V., Orlova M. D., Bogush M., Kutsev S. I., Veiko N. N., Kostyuk S. V. Accumulation of circulating cell-free CpG-enriched ribosomal DNA fragments on the background of high endonuclease activity of blood plasma in schizophrenic patients // *International journal of genomics*. – 2019. – V. 2019. – Article №. 8390585.
391. Lood C., Blanco L. P., Purmalek M. M., Carmona-Rivera C., De Ravin S. S., Smith C. K., Malech H. L., Ledbetter J. A., Elkon K. B., Kaplan M. J. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease // *Nature medicine*. – 2016. – V. 22. – №. 2. – P. 146.
392. Marsman G., Zeerleder S., Luken B. M. Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation // *Cell death & disease*. – 2016. – V. 7. – №. 12. – P. e2518-e2518.
393. Rekvig O. P. The anti-DNA antibody: origin and impact, dogmas and controversies // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2015. – V. 11. – №. 9. – P. 530.
394. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Autoantibodies and natural catalytic antibodies in health, multiple sclerosis, and some other diseases // *Advances in Neuroimmune Biology*. – 2012. – V. 3. – №. 2. – P. 157-182.

395. Spivak B., Radwan M., Bartur P., Mester R., Weizman A. Antinuclear autoantibodies in chronic schizophrenia // *Acta Psychiatrica Scandinavica*. – 1995. – V. 92. – №. 4. – P. 266-269.
396. Johnstone E. C., Whaley K. Antinuclear antibodies in psychiatric illness: their relationship to diagnosis and drug treatment // *British Medical Journal*. – 1975. – V. 2. – №. 5973. – P. 724-725.
397. Смирнова Л. П., Ермаков Е. А., Бойко А. С., Бохан Н. А., Семке А. В., Иванова С. А. Антитела к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови больных шизофренией в зависимости от клинических особенностей заболевания // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2016. – Т. 116. – №. 4. – С. 47-51.
398. Sirota P., Firer M. A., Schild K., Tanay A., Elizur A., Meytes D., Slor H. Autoantibodies to DNA in multicasе families with schizophrenia // *Biological psychiatry*. – 1993. – Т. 33. – №. 6. – С. 450-455.
399. Измаилов Т.И. Исследование аутоантител к ДНК при шизофрении и других нервно-психических расстройствах // *Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 1971. – Т. 72. – №. 8. – С. 1188-1191.
400. Ter Borg E. J., Horst G., Hummel E. J., Limburg P. C., Kallenberg C. G. M. Measurement of increases in anti-double-stranded dna antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus // *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. – 1990. – V. 33. – №. 5. – P. 634-643.
401. Tan E. M., Schur P. H., Carr R. I., Kunkel H. G. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus // *The Journal of clinical investigation*. – 1966. – V. 45. – №. 11. – P. 1732-1740.
402. Kozora E., Thompson L. L., West S. G., Kotzin B. L. Analysis of cognitive and psychological deficits in systemic lupus erythematosus patients without overt central nervous system disease // *Arthritis & Rheumatism*. – 1996. – V. 39. – №. 12. – P. 2035-2045.
403. Hanly J. G., Liang M. H. Cognitive Disorders in Systemic Lupus Erythematosus: Epidemiologic and Clinical Issues // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1997. – V. 823. – №. 1. – P. 60-68.
404. DeGiorgio L. A., Konstantinov K. N., Lee S. C., Hardin J. A., Volpe B. T., Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus // *Nature medicine*. – 2001. – V. 7. – №. 11. – P. 1189.
405. Nestor J., Arinuma Y., Huerta T. S., Kowal C., Nasiri E., Kello N., Fujieda Y., Bialas A., Hammond T., Sriram U., Stevens B., Huerta P. T., Volpe B. T., Diamond B. Lupus antibodies induce behavioral changes mediated by microglia and blocked by ACE inhibitors // *Journal of Experimental Medicine*. – 2018. – V. 215. – №. 10. – P. 2554-2566.
406. Gololobov G. V., Chernova E. A., Schourov D. V., Smirnov I. V., Kudelina I. A., Gabibov A. G. Cleavage of supercoiled plasmid DNA by autoantibody Fab fragment: application of the flow linear dichroism technique // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – V. 92. – №. 1. – P. 254-257.
407. Fukunaga A., Maeta S., Reema B., Nakakido M., Tsumoto K. Improvement of antibody affinity by introduction of basic amino acid residues into the framework region // *Biochemistry and biophysics reports*. – 2018. – V. 15. – P. 81-85.
408. Leffler J., Martin M., Gullstrand B., Tydén H., Lood C., Truedsson L., Bengtsson A. A., Blom A. M. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease // *The Journal of Immunology*. – 2012. – V. 188. – №. 7. – P. 3522-3531.
409. Tamkovich S. N., Cherepanova A. V., Kolesnikova E. V., Rykova E. Y., Pyshnyi D. V., Vlassov V. V., Laktionov P. P. Circulating DNA and DNase activity in human blood // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – V. 1075. – №. 1. – P. 191-196.
410. Власов А.В. Рибонуклеазы человека // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63. – №. 12. – С. 1587–1599.
411. Brünger A. T., Brooks C. L., Karplus M. Active site dynamics of ribonuclease // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1985. – V. 82. – №. 24. – P. 8458-8462.
412. Cao D. D., Li L., Chan W. Y. MicroRNAs: key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – V. 17. – №. 6. – P. 842.

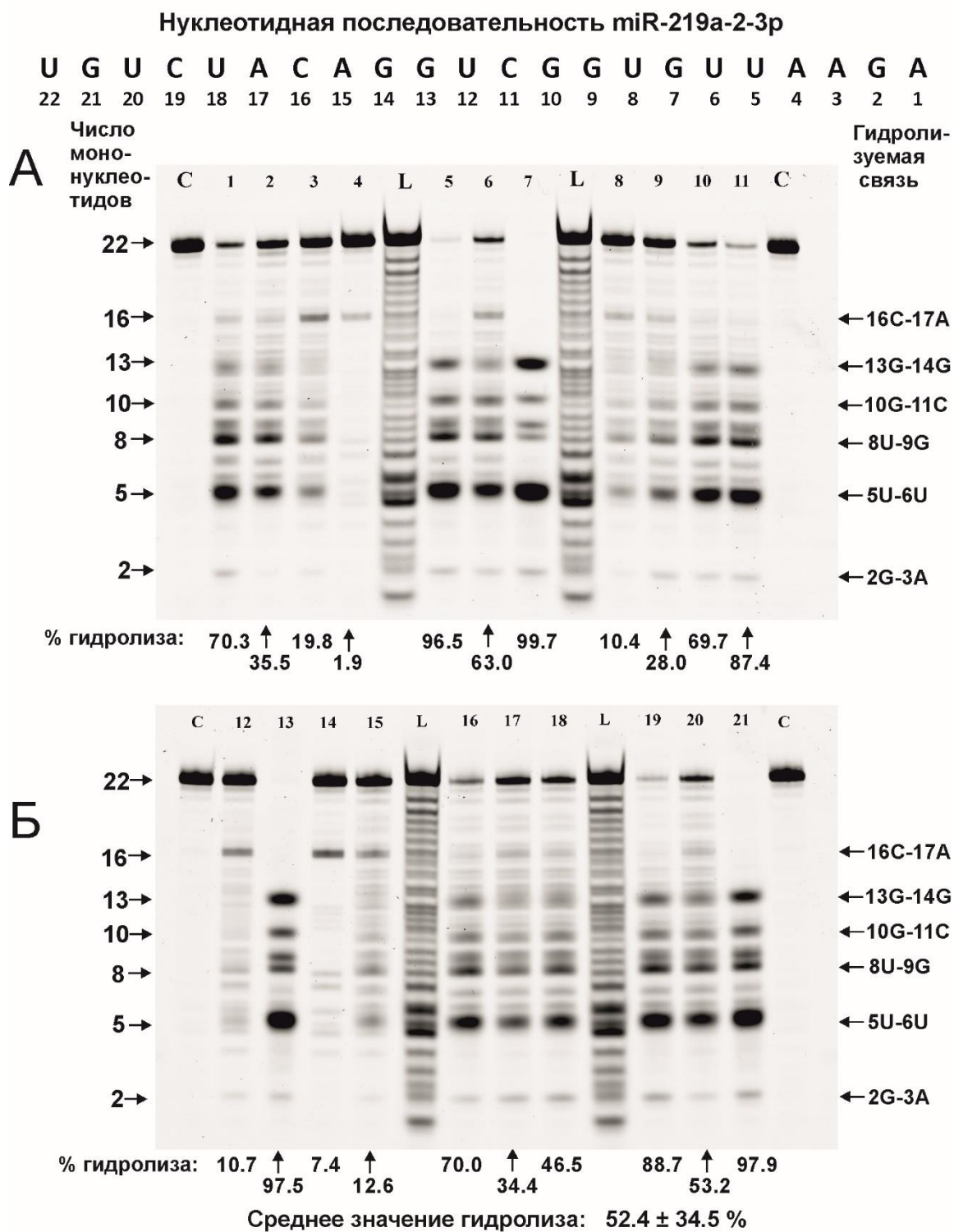
- 
413. Trivedi S., Ramakrishna G. miRNA and neurons // *International Journal of Neuroscience*. – 2009. – V. 119. – №. 11. – P. 1995-2016.
414. Wang Y., Han Z., Fan Y., Zhang J., Chen K., Gao L., Zeng H., Cao J., Wang C. MicroRNA-9 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human atherosclerosis inflammation cell models through the JAK1/STAT signaling pathway // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – V. 41. – №. 4. – P. 1555-1571.
415. Fredman G., Li Y., Dalli J., Chiang N., Serhan C. N. Self-limited versus delayed resolution of acute inflammation: temporal regulation of pro-resolving mediators and microRNA // *Scientific reports*. – 2012. – V. 2. – №. 1. – P. 1-9.
416. Davies D. B., Pahomov V. I., Veselkov A. N. NMR determination of the conformational and drug binding properties of the DNA heptamer d (GpCpGpApApGpC) in aqueous solution // *Nucleic acids research*. – 1997. – V. 25. – №. 22. – P. 4523-4531.
417. Andreev S. L., Buneva V. N., Nevinsky G. A. How human IgGs against DNA recognize oligonucleotides and DNA // *Journal of Molecular Recognition*. – 2016. – V. 29. – №. 12. – P. 596-610.
418. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Human catalytic RNA-and DNA-hydrolyzing antibodies // *Journal of immunological methods*. – 2002. – V. 269. – №. 1-2. – P. 235-249.
419. Hartmann G. *Nucleic acid immunity* // *Advances in immunology*. – Academic Press, 2017. – V. 133. – P. 121-169.
420. Lehmann S. M., Krüger C., Park B., Derkow K., Rosenberger K., Baumgart J., Trimbuch T., Eom G., Hinz M., Kaul D., Habbel P., Kälin R., Franzoni E., Rybak A., Nguyen D., Veh R., Ninnemann O., Peters O., Nitsch R., Heppner F. L., Golenbock D., Schott E., Ploegh H. L., Wulczyn F. G., Lehnardt S. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration // *Nature neuroscience*. – 2012. – V. 15. – №. 6. – P. 827-835.
421. Ostendorf T., Zillinger T., Andryka K., Schlee-Guimaraes T. M., Schmitz S., Marx S., Bayrak K., Linke R., Salgert S., Wegner J., Grasser T., Bauersachs S., Soltesz L., Hübner M. P., Nastaly M., Coch C., Kettwig M., Roehl I., Henneke M., Hoerauf A., Barchet W., Gärtner J., Schlee M., Hartmann G., Bartok E. Immune sensing of synthetic, bacterial, and protozoan RNA by toll-like receptor 8 requires coordinated processing by RNase T2 and RNase 2 // *Immunity*. – 2020. – V. 52. – №. 4. – P. 591-605.
422. Kosugi I., Muro H., Shirasawa H., Ito I. Endocytosis of soluble IgG immune complex and its transport to lysosomes in hepatic sinusoidal endothelial cells // *Journal of hepatology*. – 1992. – V. 16. – №. 1-2. – P. 106-114.
423. Ukkonen P., Lewis V., Marsh M., Helenius A., Mellman I. Transport of macrophage Fc receptors and Fc receptor-bound ligands to lysosomes // *The Journal of experimental medicine*. – 1986. – V. 163. – №. 4. – P. 952-971.
424. Inoue K., Ishizawa M., Kubota T. Monoclonal anti-dsDNA antibody 2C10 escorts DNA to intracellular DNA sensors in normal mononuclear cells and stimulates secretion of multiple cytokines implicated in lupus pathogenesis // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2020. – V. 199. – №. 2. – P. 150-162.
425. Redis R. S., Calin S., Yang Y., You M. J., Calin G. A. Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy // *Pharmacology & therapeutics*. – 2012. – V. 136. – №. 2. – P. 169-174.
426. Slastnikova T. A., Ulasov A. V., Rosenkranz A. A., Sobolev A. S. Targeted intracellular delivery of antibodies: The state of the art // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – V. 9. – P. 1208.
427. Choi D. K., Bae J., Shin S. M., Shin J. Y., Kim S., Kim Y. S. A general strategy for generating intact, full-length IgG antibodies that penetrate into the cytosol of living cells // *MAbs*. – 2014. – V. 6. – №. 6. – P. 1402-1414.
428. Allam R., Kumar S. V., Darisipudi M. N., Anders, H. J. Extracellular histones in tissue injury and inflammation // *Journal of molecular medicine*. – 2014. – V. 92. – №. 5. – P. 465-472.
429. Chen R., Kang R., Fan X. G., Tang D. Release and activity of histone in diseases // *Cell death & disease*. – 2014. – V. 5. – №. 8. – P. e1370-e1370.
430. Remijnsen Q., Kuijpers T. W., Wirawan E., Lippens S., Vandenabeele P., Berghe T. V. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality // *Cell Death & Differentiation*. – 2011. – V. 18. – №. 4. – P. 581-588.
431. Chengappa K. N. R., Carpenter A. B., Yang Z. W., Brar J. S., Rabin B. S., Ganguli R. Elevated IgG anti-histone antibodies in a subgroup of medicated schizophrenic patients // *Schizophrenia research*. – 1992. – V. 7. – №. 1. – P. 49-54.

- 
432. Villemain F., Magnin M., Feuillet-Fieux M. N., Zarifian E., Loo H., Bach J. F. Anti-histone antibodies in schizophrenia and affective disorders // *Psychiatry research*. – 1988. – V. 24. – №. 1. – P. 53-60.
433. Fournel S., Muller S. Anti-nucleosome antibodies and T-cell response in systemic lupus erythematosus // *Annales de medecine interne*. – 2002. – V. 153. – №. 8. – P. 513.
434. Rekvig O. P. The anti-DNA antibody: origin and impact, dogmas and controversies // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2015. – V. 11. – №. 9. – P. 530.
435. Baranova S. V., Mikheeva E. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies from the sera of multiple sclerosis patients efficiently hydrolyze five histones // *Biomolecules*. – 2019. – V. 9. – №. 11. – P. 741.
436. Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions // *Biochimie*. – 2008. – V. 90. – №. 2. – P. 194-207.
437. Baranova S. V., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Antibodies from the sera of HIV-infected patients efficiently hydrolyze all human histones // *Journal of Molecular Recognition*. – 2016. – V. 29. – №. 8. – P. 346-362.
438. Baranova S. V., Dmitrienok P. S., Buneva V. N., Nevinsky G. A. Autoantibodies in HIV-infected patients: Cross site-specific hydrolysis of H1 histone and myelin basic protein // *BioFactors*. – 2019. – V. 45. – №. 2. – P. 211-222.
439. Eisen H. N. Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses // *Cancer immunology research*. – 2014. – V. 2. – №. 5. – P. 381-392.
440. Gettins P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function // *Chemical reviews*. – 2002. – V. 102. – №. 12. – P. 4751-4804.
441. Janciauskiene S., Wrenger S., Immenschuh S., Olejnicka B., Greulich T., Welte T., Chorostowska-Wynimko J. The multifaceted effects of alpha1-antitrypsin on neutrophil functions // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – V. 9. – P. 341.
442. Mannucci P. M. Hemostatic drugs // *New England Journal of Medicine*. – 1998. – V. 339. – №. 4. – P. 245-253.

# Приложение

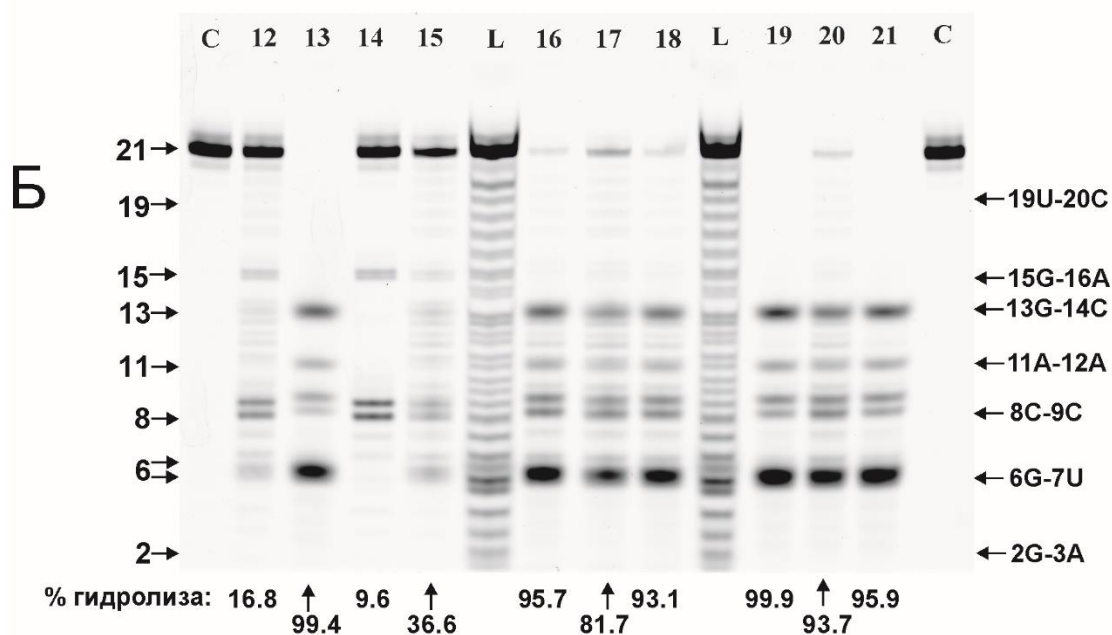
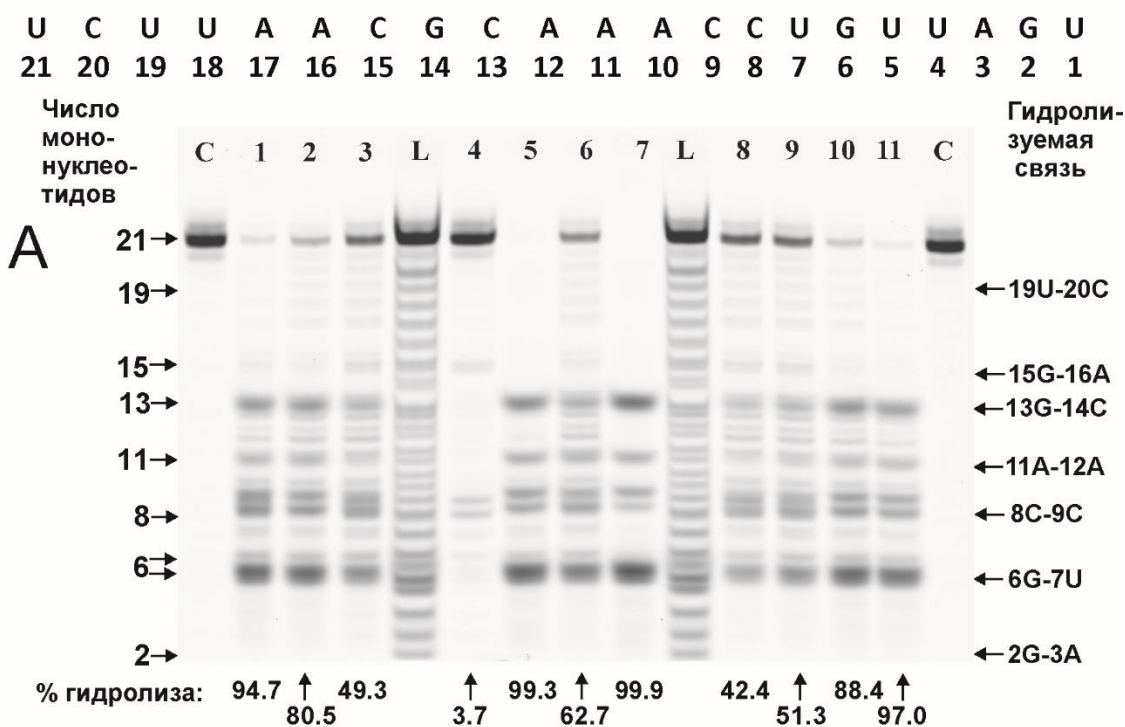


**Рис. П 1.** Паттерны гидролиза miR-9-5p под действием IgG пациентов с шизофренией. А, Б – анализ продуктов реакции гидролиза miR-9-5p в 20% ПААГ в денатурирующих условиях под действием IgG. Дорожка С – контрольная реакционная смесь, не содержащая IgG. Дорожки 1-21 – реакционные смеси, содержащим IgG различных пациентов. Дорожки L – маркеры фрагментов miR-9-5p различной длины, полученные путем статитического щелочного гидролиза.



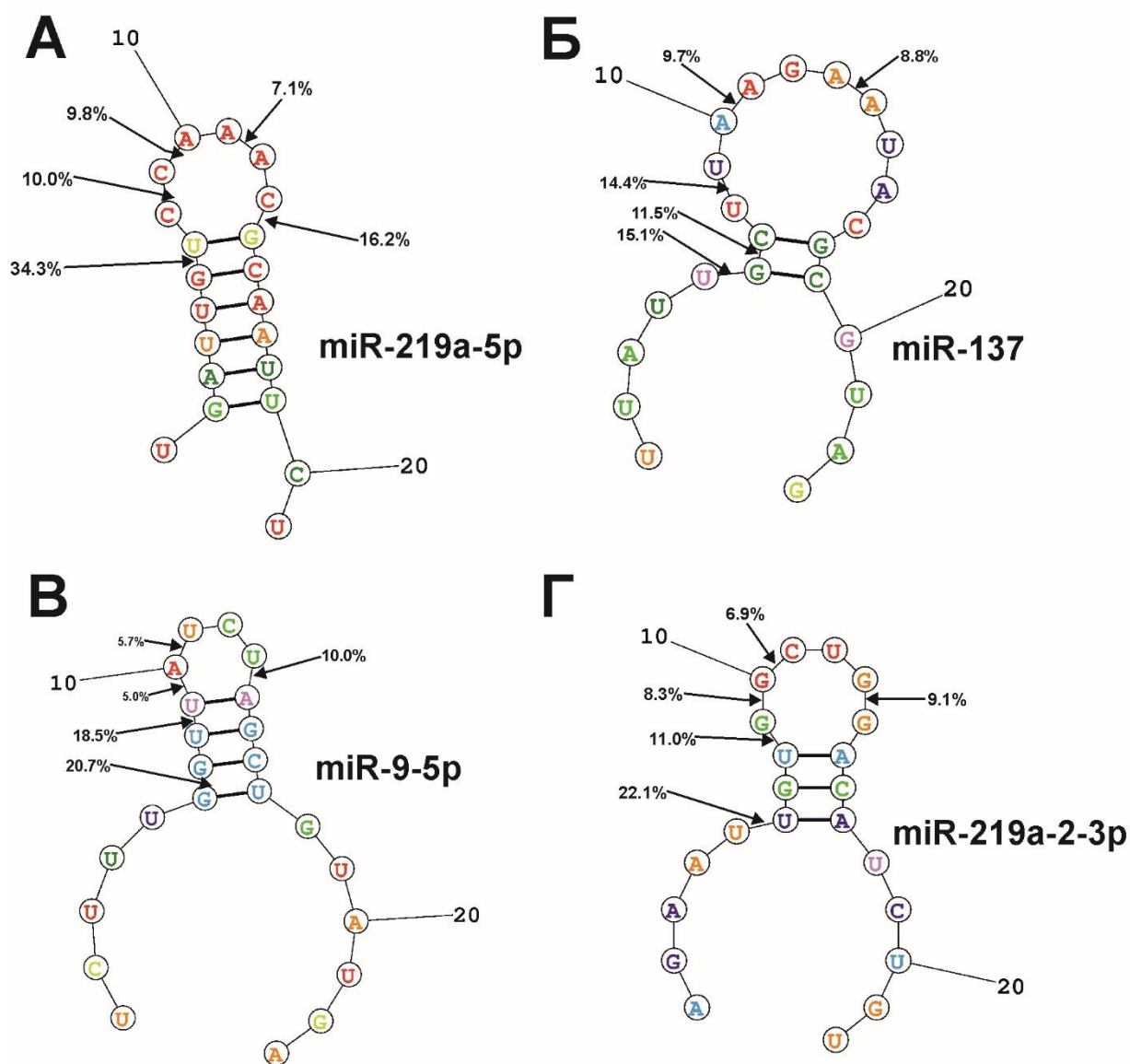
**Рис. П 2.** Паттерны гидролиза miR-219-2-3p под действием IgG пациентов с шизофренией. А, Б – анализ продуктов реакции гидролиза miR-219-2-3p в 20% ПААГ в денатурирующих условиях под действием IgG. Дорожка С – контрольная реакционная смесь, не содержащая IgG. Дорожки 1-21 – реакционные смеси, содержащим IgG различных пациентов. Дорожки L – маркеры фрагментов miR-219-2-3p различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

### Нуклеотидная последовательность miR-219a-5p



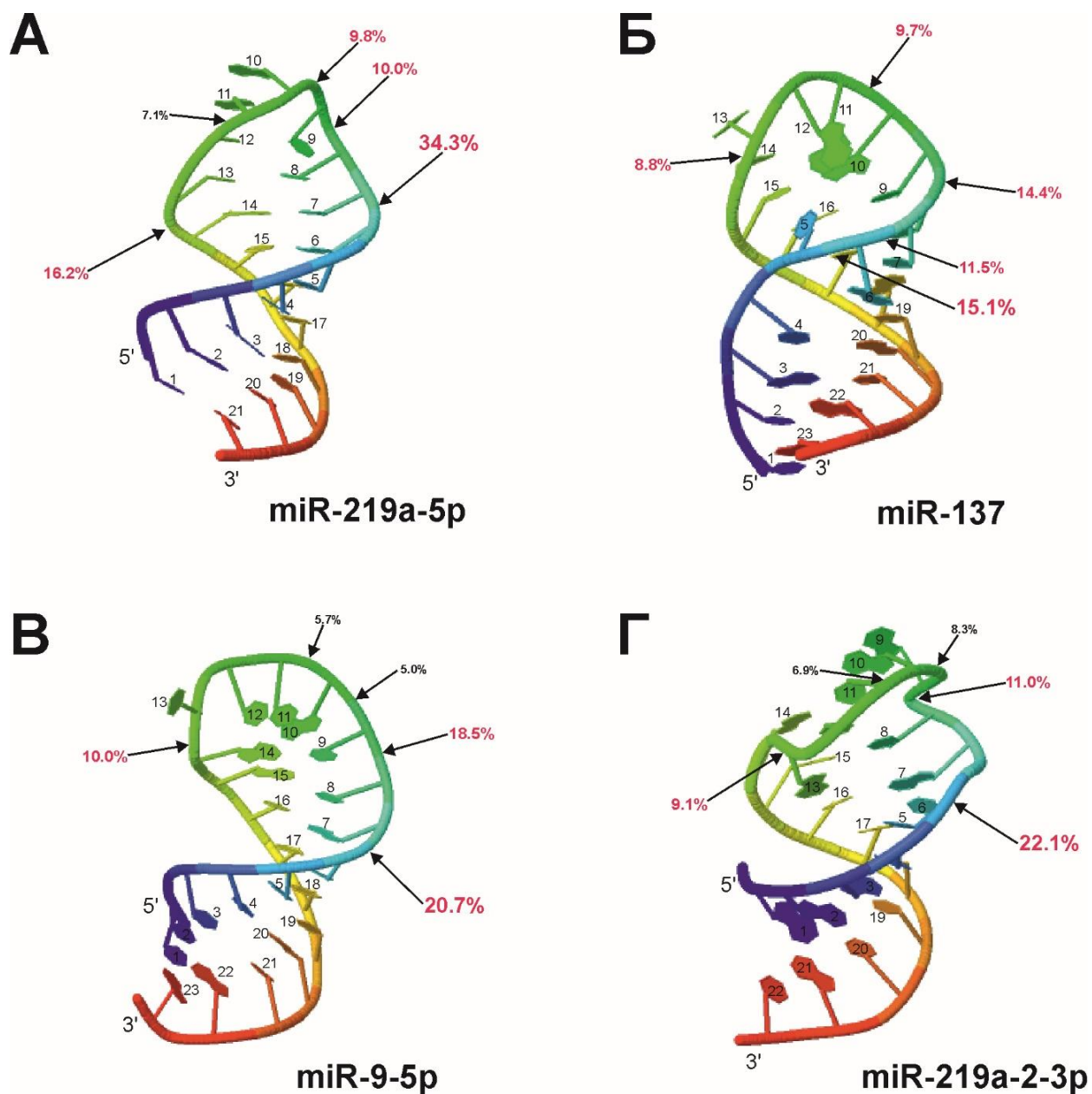
Среднее значение гидролиза:  $71.0 \pm 32.7 \%$

**Рис. П 3.** Паттерны гидролиза miR-219-5p под действием IgG пациентов с шизофренией. А, Б – анализ продуктов реакции гидролиза miR-219-5p в 20% ПААГ в денатурирующих условиях под действием IgG. Дорожка С – контрольная реакционная смесь, не содержащая IgG. Дорожки 1-21 – реакционные смеси, содержащим IgG различных пациентов. Дорожки L – маркеры фрагментов miR-219-5p различной длины, полученные путем статистического щелочного гидролиза.

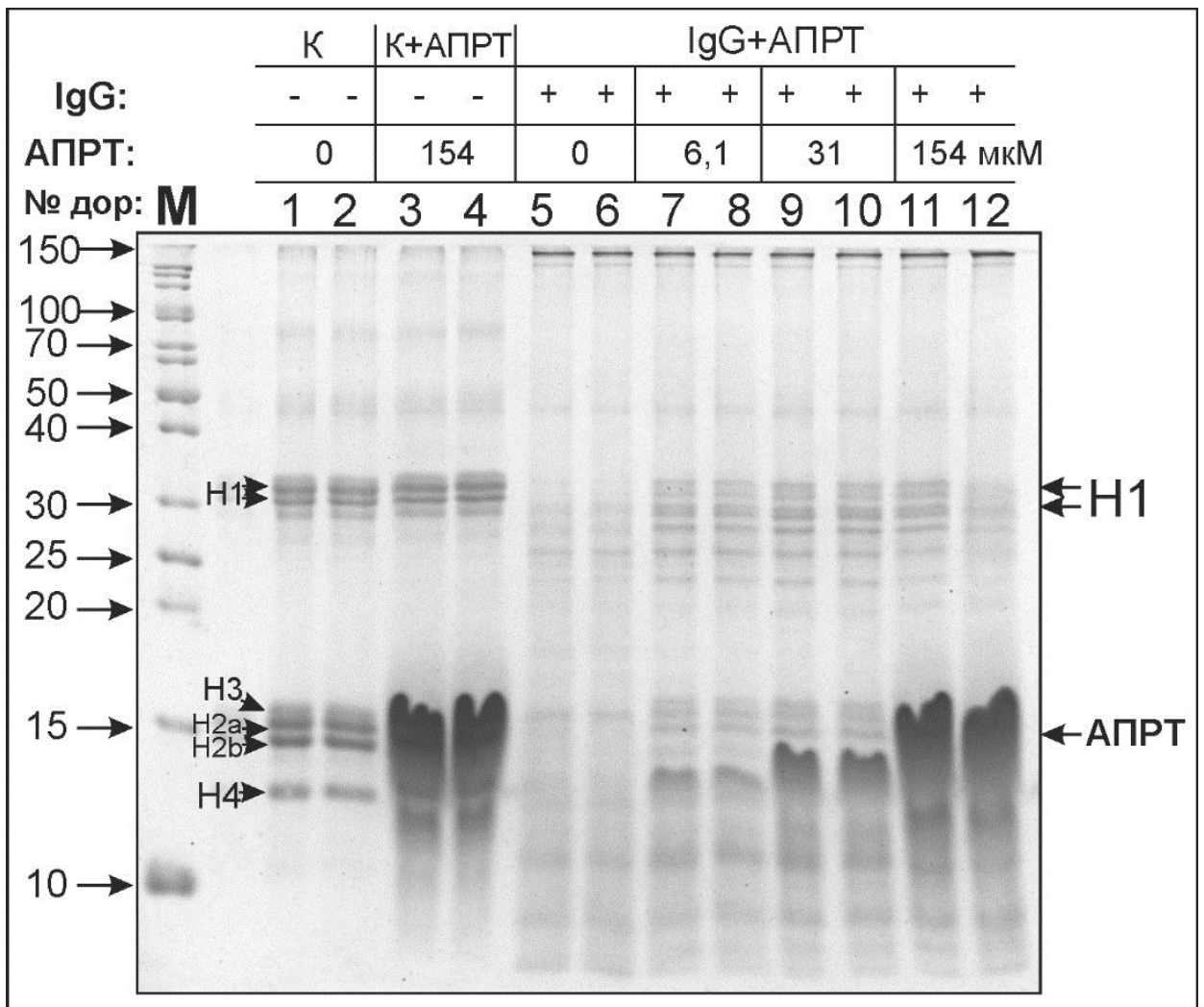


**Рис. П 4.** Рассчитанные двумерные пространственные структуры четырех микроРНК (А–Г) и средняя эффективность гидролиза в основных участках расщепления этих микроРНК 21-им препаратом IgG больных шизофренией. Двумерные вторичные структуры микроРНК с минимальной свободной энергией предсказаны с помощью Predict a Secondary Structure сервера (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>) [325].





**Рис. П 5.** Рассчитанные трехмерные структуры четырех микроРНК (А–Г) и средняя эффективность гидролиза в основных участках расщепления этих микроРНК 21-им препаратом IgG больных шизофренией. Трехмерные структуры микроРНК с минимальной свободной энергией в водном растворе предсказаны с использованием SimRNAweb сервера (<http://genesilico.pl/SimRNAweb>) [326].



**Рис. П 6.** Ингибирование гистон-гидролизующей активности препарата IgG больного шизофренией под действием апротинина. На дорожках «K» (1, 2) нанесены интактные гистоны (H1, H2a, H2b, H3 и H4). Дорожки «K+АПРТ» (3, 4) соответствуют реакционным смесям, содержащим гистоны и апротинин. На дорожки 6-12 в повторах нанесены реакционные смеси, содержащие гистоны, IgG (0,67 мМ) и апротинин в указанной на рисунке концентрации. Дорожка M соответствует маркерам молекулярной массы белков.

**Таблица П 1.** Гистон-гидролизующая активность IgG пациентов в зависимости от ведущей симптоматики шизофрении.

Группа пациентов		Гистон-гидролизующая активность IgG, %				
		H1	H2a	H2b	H3	H4
Общая группа пациентов (n=50)	Среднее ± SD	18,6 ± 25,3	16,0 ± 22,7	15,7 ± 23,5	12,8 ± 22,0	19,2 ± 26,3
	Медиана [Q1; Q3]	8,5 [6,1; 15,5]	8,5 [4,3; 13,2]	6,7 [3,3; 15,4]	6,5 [3,6; 8,5]	7,9 [5,7; 16,8]
	Среднее ± SD для H1–H4	16,4 ± 23,9				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	7,6 [4,3; 14,4]				
Пациенты с ведущей позитивной симптоматикой (n=22)	Среднее ± SD	13,4 ± 14,2	12,0 ± 11,0	13,0 ± 9,9	8,6 ± 6,6	17,2 ± 22,0
	Медиана [Q1; Q3]	7,8 [6,1; 10,7]	10,6 [5,2; 13,0]	9,9 [3,4; 13,5]	7,1 [6,1; 11,3]	7,8 [6,4; 12,8]
	Среднее ± SD для H1–H4	12,8 ± 14,3				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	7,8 [5,9; 13,0]				
Пациенты с ведущей негативной симптоматикой (n=28)	Среднее ± SD	22,6 ± 31,0	19,2 ± 28,6	18,0 ± 29,3	16,1 ± 28,6	20,8 ± 29,6
	Медиана [Q1; Q3]	9,3 [6,3; 17,6]	7,3 [4,2; 15,6]	5,6 [3,3; 17,0]	5,3 [3,1; 8,4]	8,8 [5,0; 18,7]
	Среднее ± SD для H1–H4	19,3 ± 29,1				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	7,3 [4,0; 17,1]				
Достоверность различий ( <i>p</i> ) между пациентами с позитивной и негативной симптоматикой <sup>2</sup>		0,374	0,664	0,498	0,341	0,92

<sup>1</sup>SD – стандартное отклонение.

<sup>2</sup>Достоверность различий (*p*) между группами рассчитана с использованием критерия Манна-Уитни.

**Таблица П 2.** Гистон-гидролизующая активность IgG пациентов в зависимости от типа шизофрении.

Тип шизофрении согласно МКБ-10 <sup>1</sup>		Гистон-гидролизующая активность IgG, %				
		H1	H2a	H2b	H3	H4
F20.00 Параноидная шизофрения с непрерывным течением (n=11)	Среднее ± SD	24,3 ± 31,9	21,6 ± 27,5	16,1 ± 27,3	21,6 ± 28,3	23,3 ± 31,2
	Медиана [Q1; Q3]	11,0 [6,4; 26,4]	12,4 [5,1; 27,8]	5,4 [0; 16,4]	10,6 [5,2; 27,8]	7,8 [6,9; 28,2]
	Среднее ± SD для H1–H4	21,4 ± 28,4				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	7,8 [5,1; 27,8]				
F20.01 Параноидная шизофрения, эпизодическое течение с нарастающим дефектом (n=14)	Среднее ± SD	12,8 ± 13,5	9,3 ± 9,1	9,9 ± 10,4	9,0 ± 4,7	16,6 ± 22,7
	Медиана [Q1; Q3]	8,4 [6,0; 11,9]	7,0 [2,8; 12,0]	7,8 [4,0; 11,5]	7,4 [6,6; 11,3]	7,6 [4,6; 13,0]
	Среднее ± SD для H1–H4	11,5 ± 13,4				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	7,5 [5,1; 12,4]				
F20.02 Параноидная шизофрения, эпизодическое со стабильным дефектом (n=11)	Среднее ± SD	22,7 ± 31,3	17,8 ± 28,0	17,5 ± 30,5	15,6 ± 28,7	21,6 ± 30,7
	Медиана [Q1; Q3]	7,3 [4,4; 30,9]	6,3 [3,5; 17,9]	3,2 [1,4; 17,3]	3,4 [0; 13,4]	6,5 [2,7; 28,0]
	Среднее ± SD для H1–H4	19,0 ± 28,9				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	6,3 [1,7; 21,6]				
F20.09 Параноидная шизофрения, течение неясное, период наблюдения менее года (n=8)	Среднее ± SD	23,1 ± 31,6	22,2 ± 31,0	18,9 ± 32,7	17,0 ± 31,2	22,5 ± 31,4
	Медиана [Q1; Q3]	9,9 [8,4; 19,3]	10,3 [8,1; 16,3]	7,2 [4,8; 14,8]	7,1 [5,3; 8,1]	11,5 [9,1; 17,4]
	Среднее ± SD для H1–H4	20,7 ± 30,0				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	9,2 [6,1; 16,0]				
F20.6 Простая шизофрения (n=6)	Среднее ± SD	7,7 ± 2,7	9,8 ± 3,7	11,6 ± 6,7	4,9 ± 2,8	9,3 ± 4,9
	Медиана [Q1; Q3]	7,6 [6,3; 8,8]	10,5 [7,6; 12,9]	10,9 [5,1; 15,6]	5,3 [4,5; 6,0]	7,5 [7,2; 9,2]
	Среднее ± SD для H1–H4	8,5 ± 4,6				
	Медиана [Q1; Q3] для H1–H4	7,6 [5,3; 11,3]				
Достоверность различий (p) между разными типами шизофрений <sup>2</sup>		0,631	0,661	0,444	0,421	0,684

<sup>1</sup>МКБ-10 - Международная классификация болезней Десятого пересмотра.

<sup>2</sup> Достоверность различий (p) рассчитана с использованием критерия Краскела-Уоллиса.