



УДК 577.15.08

ИНГИБИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ АКТИВИРОВАННОГО С4b-КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА С МИШЕНЬЮ

© 2000 г. Л. В. Козлов[#], В. М. Лахтин, Т. Г. Скороходова, Т. Н. Баталова, Б. Б. Шойбонов, В. Л. Дьяков, В. А. Гузова, Н. С. Матвеевская

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Поступила в редакцию 28.09.99 г. Принята к печати 22.06.2000 г.

Исследовано ингибирование ковалентного связывания активированного С4b-фрагмента компонента комплемента человека с его естественной мишенью – иммуноглобулином G человека. С этой целью разработана иммуоферментная система, в которой происходит активация комплемента на сорбированных молекулах IgG и образующийся активированный фрагмент С4b ацилирует IgG или связывается с добавленным в систему конкурирующим ингибитором. Определены константы ингибирования связывания активированного С4b с мишенью для иммуноглобулинов G1, G2, G3, G4, M и A1, ферритина, дрожжевого маннана, капсульных полисахаридов *Neisseria meningitidis* серогрупп А, В и С, дифтерийного анатоксина, адреналина и салициловой кислоты. На основании полученных данных сделаны выводы о роли иммуноглобулинов в регуляции каскада активации комплемента, о связи иммуногенности антигена с его способностью взаимодействовать с С4b и о прямом действии ряда лекарственных веществ на систему комплемента. Показано ингибирование лектинами различной специфичности ферментативной реакции активации С4 первым компонентом комплемента и последующей сорбции С4b на мишени, что позволило высказать предположение о пространственной близости некоторых из олигосахаридных фрагментов молекул С1s и С4 к активному центру С1s и к тиолсложноэфирной связи С4.

Ключевые слова: система комплемента; активированный С4b; иммуноглобулины; полисахариды *Neisseria meningitidis*; лектины; салициловая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Компонент С4 комплемента участвует в классическом и лектиновом путях комплемента. В первом случае он активируется субкомпонентом С1s первого компонента комплемента, во втором – протеиназой MASP, ассоциированной с маннозосвязывающим лектином (MBL) [1]. При активации С4 отщепляется N-концевой активационный пептид С4a, играющий роль анафилатоксина. В остающемся фрагменте С4b становится доступной растворителю тиолсложноэфирная связь, богатая энергией и способная чрезвычайно быстро гидролизироваться или расщепляться под действием другой нуклеофильной молекулы, с которой образуется новая ковалентная связь [2]. Поэтому в момент своего образования активированный С4b способен ковалентно иммобилизоваться на подходящей мишени, в качестве которой оказываются близко расположенные молекулы активатора, активирующих антигел, антигена (в случае классического пути) или полисахарид (в случае лектинового пути).

Иммобилизация С4b преследует две цели. Первая – это формирование нового иммобилизованного фермента – С3-конвертазы (С4b2a) клас-

сического пути (а также лектинового, поскольку с этого момента оба пути не различаются); далее на иммобилизованном С4b связывается Mg^{2+} -зависимым образом компонент С2, который затем активируется с образованием С2a. С3-конвертаза в свою очередь приводит к опсонизации мишени ковалентно связанным С3b, что необходимо для развития иммунного ответа. Вторая цель – мечение мишени (в частности, иммунного комплекса) молекулой С4b для узнавания мишени рецептором CR1 (CD35). В случае иммунного комплекса это осуществляется с целью его удаления [3].

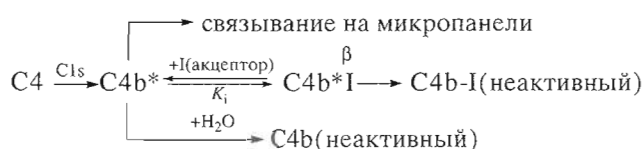
Поскольку для ковалентного связывания С3b необходима С3-конвертаза, формирование которой также начинается с активации компонента С4 и ковалентного связывания С4b, то способность последнего иммобилизоваться на поверхности мишени или иммунном комплексе определяет дальнейшее связывание С3b. Кроме того, иммобилизованный на поверхности мишени С4b сам является мишенью, с которой ковалентно связывается активированный С3b. Показано, что при опсонизации клеточной поверхности половина С3b, участвующего в этом процессе, связана с С4b [4]. В свою очередь С3b и продукты его дальнейшей фрагментации С3dg и С3d являются ли-

[#] Автор для переписки (e-mail: l.v.kozlov@mtu-net.ru).

гандами рецептора CR2 (CD21). Оба упомянутых рецептора, представленные на дендритных клетках, макрофагах, В-лимфоцитах, вносят вклад в локализацию и презентацию антигенов в виде комплексов антиген-антитело в герминальных центрах лимфатических узлов, в генерирование и поддержание В-клеток памяти, в активацию и пролиферацию В-клеток [5–7]. Показано, что присоединение C3d к антигену усиливает иммунный ответ в ~10000 раз [8]. Накопленные в последнее время данные показывают, что снижение уровней компонента C3, а также участвующих в активации последнего C2 и C4 ведет к существенному ухудшению иммунного ответа [9–12]. Из этих данных следует, что иммуногенность антигена во многом определяется его способностью опсонизироваться компонентами комплемента и вследствие этого способностью взаимодействовать с рецепторами CR1, CR2 и CR3 (CD11b/CD18), экспрессируемыми на дендритных клетках [5]. Все вышеизложенное свидетельствует о том, что способность активированного C4b связываться с мишенью, а также ингибирование этого процесса могут иметь далеко идущие последствия как для процесса активации комплемента и реализации его литической функции, так и для эффекторной роли комплемента в иммунном ответе и развитии процессов воспаления.

Ранее нами было исследовано ингибирование образования C5-конвертазы классического пути комплемента, обусловленное ковалентным связыванием ингибитора с активированным C3b [3–5]. При этом было показано, что при таком взаимодействии первоначально образуется обратимый комплекс ингибитора с узнающим субстратным центром C3b, а затем происходит необратимое ковалентное связывание с активированным C3b за счет его тиолсложноэфирной связи. Это напоминает ферментативный процесс, включающий сорбцию субстрата в активном центре фермента и последующий каталитический акт. Поэтому изучаемое ингибирование также описывается уравнением Михаэлиса–Ментен.

Полная химическая аналогия в процессах ковалентного связывания активированных компонентов C3b и C4b позволяет полагать, что взаимодействие с C4b, как и в случае реакции активированного C3b (механизм доказан нами в работах [13–15]), начинается с образования нековалентного сорбционного комплекса с акцептором, т.е. имеется определенная (хотя и достаточно широкая, как будет видно из дальнейшего изложения) специфичность в узнавании акцептора субстратным участком C4b (схема):



Как и для аналогичной схемы, описанной ранее [13], ингибирование связывания C4b на микропанели при условии, когда концентрация акцептора [I] много выше концентрации компонента C4, описывается уравнением Михаэлиса–Ментен:

$$\alpha = \frac{\beta[I]}{K_i + [I]}$$

где α – доля связанного с ингибитором активированного C4b (процент ингибирования), β – эффективность процесса ковалентного присоединения ингибитора к C4b (максимальный процент ингибирования), K_i – константа диссоциации обратимого комплекса акцептора (ингибитора) с C4b, [I] – концентрация ингибитора.

Цель данного исследования – изучение специфичности ингибиторов ковалентного связывания активированного C4b-компонента комплемента с его мишенью – иммуноглобулином G.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения ковалентного связывания активированного C4b с различными акцепторами мы воспользовались разработанным нами иммуноферментным методом определения функциональной активности C4 [16]. В этом методе в лунках микропанели, покрытых агрегированным иммуноглобулином G, осуществляли активацию компонента C1 морской свинки, связывающегося на агрегированных молекулах иммуноглобулина, затем в лунки вносили сыворотку крови человека как источник компонента C4 в присутствии или в отсутствие ингибитора – потенциального акцептора активированного C4b. Происходила активация C4 и образующийся C4b связывался либо со своей природной мишенью – иммуноглобулинами, сорбированными в лунках, либо с конкурирующими молекулами акцептора – ингибитора. Количество связавшегося в лунках C4b определяли с помощью моноспецифических поликлональных кроличьих антител против C4 человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. Уменьшение количества связавшегося в лунках C4b в присутствии конкурирующего акцептора рассматривалось как ингибирование связывания.

Образующийся короткоживущий активированный C4b может реагировать: 1) с водой – и инактивироваться, 2) с целевой мишенью – иммуноглобулинами, сорбированными в лунке, и 3) с молекулами акцептора. Количество связавшегося в лунках C4b в отсутствие ингибитора принимали за 100%-ную активность (A_{100}). Кроме того, оценивали активность, определенную в присутствии ингибитора (A_i). Степень ингибирования (α , %) рассчитывали по формуле:

$$\alpha = 100(A_{100} - A_i)/A_{100}$$

Для расчетов была применена разработанная ранее итерационная программа для расчета констант уравнения Михаэлиса–Ментен [13–15].

Адекватность предложенной математической модели, предусматривающей стадию образования первоначального обратимого комплекса активированной молекулы C4b с ингибитором, показала дальнейшие определения констант ингибирования для различных акцепторов. Во всех случаях были получены индивидуальные, неодинаковые для разных соединений константы, а экспериментальные точки соответствовали теоретической кривой, как это показано на рисунке для одного из ингибиторов – IgG4.

Поскольку после активации компонентом C1, сорбированным на иммунных комплексах, образующийся C4b ковалентно связывается с активирующей поверхностью, каковой могут быть иммунные комплексы, т.е. антитела и антигены, то способность антител (и/или антигенов) акцептировать активированный C4b является необходимым условием развития каскада активации компонента – инициации образования C3-конвертазы. Однако эти же (или другие) вещества, находящиеся в растворе в микроокружении активаторов, но не на самой активирующей мишени, перехватывая на себя активированный C4b, могут ограничивать развитие каскада активации. В этом, возможно, состоит их регуляторная роль. Кроме того, связывание C4b на мишени – необходимая стадия опсонизации, как это было рассмотрено выше.

Исследована способность различных веществ акцептировать активированный C4b. Прежде всего интерес представляла роль иммуноглобулинов в развитии и контроле активации компонента. Иммуноглобулины могут участвовать в следующих процессах, связанных с активацией системы компонента:

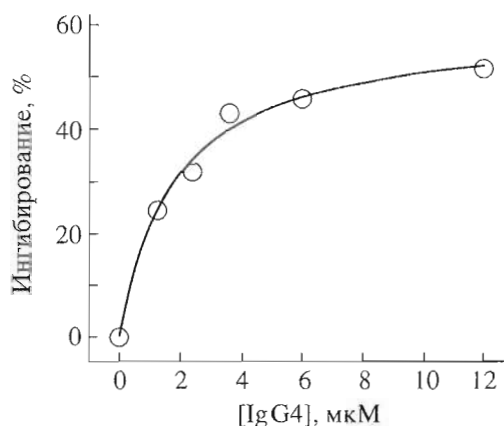
1) Антиген (АГ) + Антитело (АТ) → Иммунный ответ;

2) АГ · IgG + C1 → АГ · IgG(C1) (связывание и активация компонента C1);

3) АГ · IgG(C1) + C4 → АГ · IgG(C1)-C4b (ковалентное связывание C4b с IgG);

4) АГ · IgG(C1)-C4b + C2 → АГ · IgG(C1)-C4bC2a (формирование C3-конвертазы).

Для подклассов IgG по их способности активировать классический путь компонента известен ряд уменьшения специфичности: IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4 [17, 18]. Хорошими активаторами классического пути компонента служат лишь IgG1 и IgG3. В табл. 1 приведены полученные константы ингибирования связывания C4b. Как следует из приведенных данных, IgG1 и IgG3 и в этой реакции являются наилучшими акцепторами. Однако обнаружено хорошее связывание IgG4, который практически не активирует ком-



Ингибирование ковалентного связывания активированного C4b на микропанели IgG4. Точки соответствуют экспериментальным данным, а кривая построена исходя из теоретической математической модели.

племент по классическому пути. Можно предполагать, что этот иммуноглобулин может проявлять эффекторную роль, являясь перехватчиком активированного C4b и ингибируя при этом формирование C3-конвертазы. Такая же роль может быть присуща и IgG2, а также IgA1, которые также не являются активаторами классического пути компонента. Что же касается IgM, то этот иммуноглобулин, хорошо активируя классический путь, может быть столь же хорошим акцептором C4b для формирования C3-конвертазы, как IgG1 и IgG3 (см. табл. 1).

Как уже упоминалось выше, в лектиновом пути активации компонента инициаторами являются углеводы, которые связывают MBL и на которых должен ковалентно связываться C4b, начинающий формирование C3-конвертазы. Среди таких углеводов, иницирующих лектиновый путь, первым был описан дрожжевой маннан, поэтому первоначально MBL называли также маннансвязывающим белком. В связи с этим была исследована способность маннана служить акцептором активированного C4b. Как и следовало ожидать, маннан оказался одним из лучших акцепторов (см. табл. 1).

При многих патологических состояниях наблюдается резкое увеличение содержания в сыворотке ферритина [19–22], который, как белок острой фазы, рассматривается в качестве маркера воспаления [23]. Поскольку уровень ферритина зачастую отрицательно коррелирует с гемолитической активностью сывороточного компонента [21], было исследовано действие этого белка на компонент человека. Методами, аналогичными описанным ранее [25], для определения способности веществ активировать классический путь антителонезависимым образом [24], такая активирующая способность у ферритина была

Таблица 1. Константы ингибирования связывания активированного C4b

Ингибитор	K_i	
	мкМ	мкг/мл
Иммуноглобулины		
IgG1	1.0 ± 0.2	159 ± 29
IgG2	11.1 ± 2.2	1659 ± 325
IgG3	1.4 ± 0.1	206 ± 16
IgG4	1.8 ± 0.3	267 ± 50
IgM	0.9 ± 0.6	850 ± 589
IgA1	4.2 ± 1.0	669 ± 161
Ферритин	2.5 ± 0.5	1140 ± 240
Дрожжевой маннан	1.7 ± 0.2	131 ± 36
Дифтерийный анатоксин	1.9 ± 0.8	109 ± 47
Капсульные полисахариды <i>N. meningitidis</i>		
серогруппы А		2.2 ± 0.7
серогруппы В		7.2 ± 2.5
серогруппы С		4.3 ± 1.4
Лектины		
зародышей пшеницы (смесь изолектинов) (WGA)	2.0 ± 0.7	71 ± 24
зародышей пшеницы (изолектин II)	2.9 ± 0.1	104 ± 5
зародышей пшеницы (изолектин III)	3.9 ± 1.3	139 ± 46
клубней картофеля (STA)	3.0 ± 0.4	150 ± 16
фитогемагглютинин из семян фасоли (PNA-P)	13.8 ± 3.8	413 ± 115
красной бузины (SRA)	нет ингибирования	нет ингибир.
В-субъединицы рицина (RCA)	1.4 ± 0.3	86 ± 16
семян бобовника (LAA)	нет ингибирования	нет ингибир.
Салициловая кислота	2440 ± 340	337 ± 47
Адреналин	1020 ± 220	224 ± 48

обнаружена. Кроме того, оказалось, что ферритин служит прекрасным акцептором активированного C4b (см. табл. 1). Из этого следует, что резкое увеличение концентрации ферритина в крови в остром состоянии больного может быть причиной активации комплемента и последствий этого – снижения активности комплемента вследствие его потребления и индукции биосинтеза компонентов комплемента.

Наиболее распространенными среди инфекционных антигенов являются компоненты микроорганизмов. Для того чтобы осуществлялись литическая и эффекторная функции комплемента при образовании защитными антителами иммунных комплексов с антигенами мишени, необходимо связывание этих антигенов с C4b. Компоненты микроорганизмов часто используются при конструировании вакцин. Способность этих компонентов ковалентно связываться с C4b может быть критерием иммуногенности создаваемых вакцин, поскольку без такого связывания, как

указывалось выше, невозможно развитие иммунного ответа. Для ряда соединений, входящих в состав вакцин, были определены константы их взаимодействия с активированным C4b. В табл. 1 приведены соответствующие константы ингибирования для дифтерийного анатоксина и капсульных полисахаридов *Neisseria meningitidis* серогрупп А, В и С. Показано, что дифтерийный анатоксин является акцептором активированного C4b.

Сравнительное исследование капсульных полисахаридов менингококка различных серогрупп обнаружило параллелизм их способности служить акцепторами активированного C4b и иммуногенности. По литературным данным, полисахарид серогруппы В плохой иммуноген в опытах на экспериментальных животных и человеке [26, 27]. В опытах по ингибированию связывания C4b он также худший ингибитор. Если расположить изученные полисахариды в ряд с убывающей ингибирующей способностью, то полученный ряд

Таблица 2. Анализ данных по ингибированию связывания активированного C4b лектинами (см. также табл. 1)

Действие	Лектины					
	WGA	STA	PHA-P	RCA-II	SRA	LAA
Ингибирование	+	+	+	+	-	-
Возможность связывания с C4 [29]	-	+	+	+	+	-
Возможность связывания с C1s [31, 32]	+	-	-	+	+	-

A > C > B совпадает с рядом снижающейся иммуногенности [28].

Изучаемый процесс по своей сути является реакцией протеолиза ферментом C1s субстрата C4. За этим процессом мы следим по накоплению продукта реакции C4b, спонтанно иммобилизуемого на микропанели. Поэтому ингибирование ковалентного связывания C4b может быть обусловлено рассмотренным выше перехватом молекулой-акцептором активированного C4b в момент его образования, но может быть следствием ингибирования непосредственно ферментативного процесса. Поскольку сама ферментативная реакция высокоспецифична (для C1s известны только два субстрата – компоненты C4 и C2), потенциальными ингибиторами ее могут быть рассмотрены вещества, взаимодействующие с ферментом, и тем или иным способом экранирующими его активный центр. Что касается альтернативы перехвата, ею может быть взаимодействие компонента C4 или его фрагмента C4b с веществами, экранирующими активированную тиолсложноэфирную связь. На роль таких веществ в обоих случаях хорошо подходят лектины различной специфичности, поскольку C1s и C4 являются гликопротеинами и не исключена возможность близкого расположения углеводных фрагментов их молекул к активному центру в случае C1s и тиолсложноэфирной связи в случае C4b.

Компонент C4 содержит 6,9% углеводов, включая маннозу, галактозу, глюкозамин и сиаловую кислоту: α -цепь содержит 3 связанных с аспарагином биантенных сиалированных и фукозилированных гликанов комплексного типа, β -цепь содержит связанный с аспарагином гликан олигоманнозидного типа Man₆GlcNAc₂Asn, а в γ -цепи углеводы отсутствуют [29].

Компонент C1s содержит два олигосахариды, связанных с остатками Asn159 и Asn391. Asn159 связан с биантенным бисиалированным олигосахаридом NeuAc₂Gal₂GlcNAc₄Man₃. Asn391 – с биантенным бисиалированным или триантенным трисиалированным олигосахаридом NeuAc₃Gal₃GlcNAc₅Man₃ или же фукозилированным триантенным трисиалированным NeuAc₃Gal₃GlcNAc₅Man₃Fuc₁ в соотношении приблизительно 1 : 1 : 1 [30].

Действие лектинов на гемолитическую активность компонентов комплекса было изучено в

работе М. Бойля и др. [31]. Было, в частности, показано ингибирование гемолитической активности компонентов C1 и C4 лектином типа II ридина и взаимодействие лектина зародышей пшеницы с компонентом C1, но не с C4. В работе [29] также было показано отсутствие взаимодействия лектина зародышей пшеницы с фракцией фрагментов β -цепи компонента C4, при том что сиалированные олигосахариды α -цепи, по-видимому, могли взаимодействовать с этим лектином.

В качестве ингибиторов связывания активированного C4b были изучены лектины зародышей пшеницы (WGA), клубней картофеля (STA), красной бузины (SRA), В-субъединицы ридина (RCA), семена бобовника (LAA) и фитогемагглютинин из семян фасоли (PHA-P). Полученные данные приведены в табл. 1, а анализ результатов – в табл. 2. В табл. 2, кроме того, в двух последних строках приведены результаты, ожидаемые на основании данных работы [31], строения олигосахаридов C1s и C4 [29, 30] и известной специфичности лектинов [32].

Поскольку лектин зародышей пшеницы (WGA), по данным литературы [31] и своей специфичности, способен связываться с C1s, наблюдаемое ингибирование, скорее всего, было обусловлено близостью одной из олигосахаридных цепей этого фермента к его активному центру. Лектин клубней картофеля (STA) узнает только нефукозилированные структуры [32], поэтому его ингибирующий эффект обусловлен, по-видимому, взаимодействием с одним из нефукозилированных гликанов молекулы C4. Фитогемагглютинин из семян фасоли (PHA-P) способен взаимодействовать со структурами, не содержащими сиаловых кислот [32], т.е. не может связывать гликаны молекулы C1s, и его ингибирующее действие, следовательно, обусловлено связыванием какого-то несиалированного олигосахаридного α -цепи C4. Лектин ридина (RCA), как и следовало ожидать (см. [31]), ингибировал исследуемую реакцию. Его специфичность, включающая необходимость биантенных структур, доказывает, что взаимодействие с C4, наблюдаемое в работе [31], происходит с каким-то из гликанов α -цепи, но не с олигосахаридом β -цепи молекулы C4 [29]. Отсутствие ингибирования лектином красной бузины (SRA), способным взаимодействовать с сиали-

рованными биантенными структурами [32], еще раз говорит в пользу того, что углеводная цепь, существенная для активности C4, скорее всего не сиалирована. И, наконец, отсутствие ингибирующего эффекта у лектина бобовника (LAA), специфичность которого не включает взаимодействие с сиаловыми кислотами, но для связывания которого существенно наличие в лиганде остатков фукозы, подтверждает отсутствие фукозилирования у важного для активности C4 олигосахарида.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют в пользу того, что один из трех олигосахаридных фрагментов α -цепи молекулы C4, несиалированный и нефукозилированный, находится вблизи существенной для ковалентного связывания с мишенью тиолсложноэфирной связи, и взаимодействие этого олигосахарида с лектином может экранировать эту связь и мешать присоединению активированного C4b к мишени.

В литературе имеются сведения о прямом влиянии различных лекарственных или диагностических препаратов на систему комплемента больного, что может иметь своим следствием либо отрицательное побочное действие лекарственных препаратов, либо быть связано с механизмом действия данного препарата. Наиболее ярким примером в этом отношении является действие лекарственных препаратов апрессина (гидралазина), купренила (пеницилламина) и каптоприла на компонент C4 комплемента человека [33–35]. Помимо лекарственных средств прямое действие на систему комплемента могут оказывать вещества эндогенной природы, собственные метаболиты организма, оказывающие регуляторное влияние, а также экзогенные вещества, в том числе, загрязняющие окружающую среду, т.е. экологически вредные.

Как было показано [34], терапевтический эффект купренила, препятствующий отложению иммунных комплексов, в частности в суставах, обусловлен его действием на компонент C4 в момент активации. Тот же механизм в случае гидралазина [33] и каптоприла [35], т.е. действие на C4 и подавление способности комплемента оперировать с иммунными комплексами (в частности, солибилизировать их) может приводить к вредному (побочному) действию препаратов. Этим обусловлена известная способность гидралазина вызывать лекарственную волчанку.

Для определения способности веществ взаимодействовать с компонентом C4 комплемента известны способы, основанные на ингибировании связывания радиоактивно меченного компонента C4 с сепарозой, содержащей иммобилизованный активный субкомпонент C1s [33, 35] или на ингибировании ковалентного связывания C4 с [35 S]цистеином в присутствии C1s. Недостатками этих способов является необходимость получения чистых препаратов функционально активных ком-

понентов C4 и C1s и применения радиоактивных препаратов. На основе этих способов трудно создать простую в обращении тест-систему, позволяющую характеризовать ингибирующие вещества в стандартных условиях.

Мы посчитали возможным применить используемый нами метод исследования ингибирования активированного C4b для определения возможного действия лекарственных веществ на комплемент. В качестве объектов изучения были выбраны адреналин и салициловая кислота. Ранее [15] было показано, что адреналин ингибирует образование C5-конвертазы, реагируя с активированным C3b (K_i 0.30 ± 0.07 мМ). Оказалось, что адреналин столь же успешно ингибирует активированный C4b (K_i 1.02 ± 0.22 мМ) и может обладать противовоспалительным действием благодаря блокированию каскада активации комплемента и образованию анафилатоксинов C3a и C5a. Концентрация, соответствующая такому значению K_i примерно в 1000 раз превышает концентрацию, возникающую в кровотоке при парентеральном введении максимальной лечебной дозы препарата. Однако в офтальмологической и оториноларингологической практике употребляют адреналин как сосудосуживающее (и противовоспалительное) средство в составе капель и мазей. При этом возникающая локальная концентрация адреналина лежит в области концентраций, достаточных для ингибирования активированного C4b и может объяснять его местное противовоспалительное действие.

Салициловая кислота оказывает анальгезирующее, жаропонижающее и противовоспалительное действие. Она является действующим началом самого распространенного лекарства, аспирина. При лечении ревматизма больному внутривенно вводят до 1 г салицилата натрия. Полученная нами константа ингибирования C4b салициловой кислотой составляет 337 ± 47 мкг/мл (2.44 ± 0.34 мМ). Это значение практически совпадает с терапевтической дозой препарата. Поскольку такая концентрация салициловой кислоты лежит в области значений, реально достижимых в крови при применении ее качестве лекарственного средства, можно считать, что салициловая кислота эффективно действует на комплемент больного. Это обстоятельство позволяет предположить, что при рассмотрении механизмов противовоспалительного действия салицилатов следует учитывать их способность блокировать развитие каскада активации комплемента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали компьютерные программы для метода иммуноферментного определения функциональной активности [16] и параметров уравнения Михаэлиса–Ментен [13], реализу-

емые ООО “Микрофлора” при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 96-луночные плоскодонные микропанели (планшеты) отечественного производства (ГОСНИИмедполимер, г. Москва), Твин-20, маннан дрожжевой (Sigma, США), пероксидазу хрена НПО Биохимреактив (г. Олайне, Латвия), ферритин из селезенки лошади, адреналин (все реагенты – Serva, Германия), дифтерийный анатоксин производства НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, остальные реактивы – отечественного производства качества не ниже “ч.д.а.”. Кроличьи IgG-антитела к C4 человека и конъюгаты этих антител с пероксидазой получали традиционными методами [36] (подробнее описано в работе [16]). IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 выделяли из сыворотки крови больных множественной миеломой хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman, Великобритания). Высокоочищенные по методу Готшлиха [37] капсульные полисахариды *N. meningitidis* серогрупп А, В и С любезно предоставлены В.И. Кувакиной (МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского). Лектины зародышей пшеницы получали по методам [38, 39], фитогемагглютинин из фасоли по методу [40], лектин из клубней картофеля и лектин красной бузины – производства кооператива Диагностика при Львовском НИИ гематологии и переливания крови, В-субъединица рицика D семян клещевины – производства Karlov Univ. (Прага, Чехия).

Определение ингибирования связывания активированного C4b. По 100 мкл раствора иммунохимически чистого IgG или IgM в 0.05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9.5 (концентрация белка 10–100 мкг/мл) вносили в каждую лунку плоскодонной полистироловой 96-луночной микропанели. Закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Два раза отмывали планшет вероналовым буферным раствором, pH 7.4, содержащим 0.15 М NaCl, 0.15 мМ Ca²⁺ и 0.5 мМ Mg²⁺ (VBS²⁺), по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем вытряхивания остатка жидкости. Во все лунки планшета вносили по 100 мкл VBS²⁺, по 10 мкл сыворотки морской свинки и оставляли при комнатной температуре на 30 мин, затем жидкое содержимое лунок удаляли вытряхиванием. В другой микропанели с круглодонными лунками готовили серии двукратных разведений свежей сыворотки крови человека в VBS²⁺, общий объем в лунке 50 мкл. Затем во все лунки каждой серии вносили по 50 мкл раствора изучаемого ингибитора в своей для каждой серии концентрации, а в контроле 50 мкл буфера без ингибитора, содержимое лунок этой микропанели переносили в первую микропанель. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмывки фосфатным буфером, pH 7.4, содержащим 0.15 М NaCl и 0.05% Твин-20, и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора конъюгата пероксидазы с антителами

против компонента C4 человека в том же буфере. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмывки с детергентом и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного буфера (10 мг *o*-фенилендиамина в 25 мл цитратно-фосфатного буфера, pH 5.0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 30 мин инкубации в темноте реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 492 нм. Функциональную активность препарата C4 рассчитывали с помощью компьютерной программы, в основе которой положена линейная регрессия для зависимости активности от светопоглощения продукта ферментативной реакции. Константу ингибирования K_i определяли с помощью компьютерной программы для расчета параметров уравнения Михаэлиса–Ментен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sato T., Endo Y., Matsushita M., Fujita T. // *Int. Immunol.* 1994. V. 6. P. 665–669.
2. Low S.K.A., Dodds A.W. // *Protein Science.* 1997. V. 6. P. 265–274.
3. Carroll M.C., Fischer M.B. // *Curr. Opin. Immunol.* 1997. V. 9. P. 64–69.
4. Takata Y., Kinoshita T., Kozono H., Takeda J., Tanaka E., Hong K., Inoue K. // *J. Exp. Med.* 1987. V. 165. P. 1494–1507.
5. Reynes M., Aubert J.P., Cohen J.H.M., Audouin J., Tricottet V., Diebold J., Kazatchkin M.D. // *J. Immunol.* 1985. V. 135. P. 2687–2693.
6. Ahearn J.M., Fearon D.T. // *Adv. Immunol.* 1989. V. 46. P. 183–219.
7. Carroll M.C. // *Ann. Rev. Immunol.* 1998. V. 16. P. 545–568.
8. Dempsy P.W., Allison M.E.D., Akkaraju S., Goodnow C.C., Fearon D.T. // *Science.* 1996. V. 271. P. 348–350.
9. Jackson C.G., Ochs H.D., Wedgwood R.J. // *N. Engl. J. Med.* 1979. V. 300. P. 1124–1129.
10. Ochs H.D., Wedgwood R.J., Frank M.M., Heller S.R., Hosea S.W. // *Clin. Exp. Immunol.* 1983. V. 53. P. 208–216.
11. Bottger E.C., Hoffmann T., Hadding U., Bitter-Suermann D. // *J. Immunol.* 1985. V. 135. P. 4100–4107.
12. Fearon D.T., Carter R.H. // *Ann. Rev. Immunol.* 1995. V. 13. P. 127–149.
13. Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С., Сутовская Н.С. // *Биоорг. химия.* 1985. Т. 11. С. 762–768.
14. Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С., Сутовская Н.С., Сорокина И.Б., Баркова Т.И. // *Биоорг. химия.* 1985. Т. 11. С. 1510–1518.
15. Козлов Л.В., Лебедева Т.В. // *Биоорг. химия.* 1998. Т. 24. С. 350–355.
16. Козлов Л.В., Лахтин В.М., Скороходова Т.Г., Баталова Т.Н., Шойбонов Б.Б., Дьяков В.Л., Гузо

- ва В.А., Матвеевская Н.С. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. С. 539–547.
17. Augener W., Grey H.M., Cooper N.R., Müller-Eberhard H.J. // *Immunochemistry*. 1971. V. 8. P. 1011–1020.
 18. Schumaker V.N., Calcott M.A., Spiegelberg H.L., Müller-Eberhard H.J. // *Biochemistry*. 1976. V. 15. P. 5175–5181.
 19. Ивашкина С.Г., Деречинская Е.Д., Немов В.В. // Клиническая лабораторная диагностика. 1995. № 2. С. 8–11.
 20. Ивашкина С.Г., Немов В.В., Кораблев С.Б., Лебедев М.Ю. // Гематология и трансфузиология. 1997. № 5. С. 42–43.
 21. Nishiya K., Hashimoto K. // *Clin. Exp. Rheumatol.* 1997. V. 15. P. 39–44.
 22. Celada A., Barnet M., Aguado M.T., Cruchaud A., Lambert P.H. // *Bull. Cancer*. 1982. V. 69. P. 22–27.
 23. Алешикин В.А., Новикова Л.И., Лютов А.Г., Алешикина Т.Н. // Клиническая медицина. 1988. Т. 66. С. 39–48.
 24. Козлов Л.В., Гузова В.А. Определение комплемент-активирующей активности препаратов для внутривенного введения. Методические рекомендации № 98/87 Минздрава РФ. М.: МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 1999.
 25. Козлов Л.В., Зинченко А.А., Соляков Л.С., Сизой М.Н., Ищенко А.М., Мартюшин С.В., Андреев С.В. // *Биоорг. химия*. 1983. Т. 9. С. 1047–1055.
 26. Wile F.A., Arstenstein M.S., Brandt B.L., Tramont E.C., Kasper D.L., Altieri P.L., Berman S.L., Loventhal J.P. // *J. Infect. Dis.* 1972. V. 126. P. 514–522.
 27. Moreno C., Lifely M.R., Esdaile J. // *Infect. Immun.* 1985. V. 47. P. 527–533.
 28. Muller E., Apicella M.A. // *Infect. Immun.* 1988. V. 56. P. 259–266.
 29. Chan A.C., Atkinson J.P. // *J. Immunol.* 1985. V. 134. P. 1790–1798.
 30. Petillot Y., Thibault P., Thielens N.M., Rossi V., Lacroix M., Coddeville B., Spik G., Schumaker V.N., Gagnon J., Arlaud G.J. // *FEBS Lett.* 1995. V. 358. P. 323–328.
 31. Boyle M.D.P., Langone J.J., Borsos T. // *Immunochemistry*. 1978. V. 15. P. 465–470.
 32. Лахтин В.М. // Лектины в исследовании белков и углеводов. Итоги науки и техники. Сер. биотехнология. М.: ВИНТИ, 1987. Т. 2. 290 с.
 33. Sim E., Law S.K.A. // *FEBS Lett.* 1985. V. 184. P. 323–327.
 34. Sim E., Dodds A.W., Goldin A. // *Biochem. J.* 1989. V. 259. P. 415–419.
 35. Edmonds S., Gibb A., Sim E. // *Biochem. J.* 1993. V. 289. P. 801–805.
 36. Getty D., Raykundalia C., Houba V. // *WHO IMM/PIR*. 1983. № 83.1.
 37. Gotschlich E.G., Rey M., Etienne J., Saubern W.R., Triau R., Cvjetanovic B. *Progr. Immunobiol. Standart.* Basel: Karger, 1972. V. 5. P. 485–491.
 38. Лахтин В.М., Мосолов В.В. // Новые методы практической биохимии / Ред. В.Л. Кретьевич, К.Ф. Шольц, М.: Наука, 1988. С. 102–108.
 39. Пискарев В.Е., Лахтин В.М. Изучение и применение лектинов. Тарту: Изд-во Тартуского ун-та, 1989. Т. 1. С. 113–118.
 40. Лахтин В.М., Романченко А.И. // Докл. ВАСХНИЛ. 1983. № 7. С. 46–47.

The Inhibition of Covalent Binding of the Nascent Complement Component C4b to Its Target

L. V. Kozlov[#], V. M. Lakhtin, T. G. Skorokhodova, T. N. Batalova,
V. B. Shoibonov, V. L. D'yakov, V. A. Guzova, and N. S. Matveevskaya

*Gabricheskii Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow,
ul. Admirala Makarova 10, Moscow, 125212 Russia*

The inhibition of covalent binding of the nascent C4b fragment of the human complement component to its natural target, immunoglobulin G, was studied. To this end, an immunoenzyme system was developed. In this ELISA method, the complement was activated on the sorbed IgG molecules and the resulting nascent C4b fragment acylated IgG or interacted with a competitive inhibitor added to the system. The inhibition constants for binding of the nascent C4b to its target were determined for immunoglobulins G1, G2, G3, G4, M, and A1, as well as for ferritin, yeast mannan, capsid polysaccharides of the *Neisseria meningitidis* A, B, and C serotypes, diphtheria anatoxin, epinephrine, and salicylic acid. On the basis of the experimental data, the immunoglobulin role at the activation stage of the complement regulation cascade, the relationship between the antigen immunogenicity and its ability to interact with C4b, and the direct effect of a number of therapeutic agents on the complement system were discussed. Lectins of various specificities were shown to inhibit the enzymic activation of C4 by the first complement component and the subsequent C4b sorption to its target, which allowed us to suggest that some oligosaccharide fragments of the C1s and C4 molecules are spatially close to the C1s active site and to the thioester bond of C4.

Key words: complement system, nascent C4b; immunoglobulins; lectins; *Neisseria meningitidis* polysaccharides; salicylic acid

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: l.v.kozlov@mtu-net.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 11. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.