



УДК 577.152.344.042

© 1994 Л. В. Козлов

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРОТЕИНАЗ КОМПЛЕМЕНТА

*Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии им. Г. Н. Габричевского*

Ключевые слова: комплемент, протеиназы, активация, ингибирование, регуляция.

Рассмотрены классический и альтернативный пути активации системы комплементов, представляющие собой каскад жестко регулируемых протеолитических реакций. Охарактеризованы особенности функционирования отдельных компонентов комплемента, показаны пути регуляции и ингибирования системы, реализуемые в природе для достижения наивысшей надежности при осуществлении гомеостаза.

Система комплемента представляет собой набор сывороточных белков, активирующихся в результате каскада реакций ограниченного протеолиза.

В систему комплемента включают свыше 20 белков: это белковые компоненты сыворотки крови и мембранные белки эритроцитов, лимфоцитов (иногда и других клеток, например эндотелиальных), которые являются рецепторами компонентов комплемента (или их активационных фрагментов) или регуляторами системы (факторами рестрикции). По способам активации систему комплемента условно делят на классическую и альтернативную (схема 1).

К функциям системы комплемента в настоящее время относят не только литическую (открытую первой и представляющую собой атаку клеточной стенки с последующим лизисом клетки), но и регуляторную, поскольку освобождающиеся фрагменты отдельных компонентов комплемента являются медиаторами многих воспалительных процессов организма (анафилактические реакции, секреция простагландинов, цитокинов, реакции свертывания крови и т. п.).

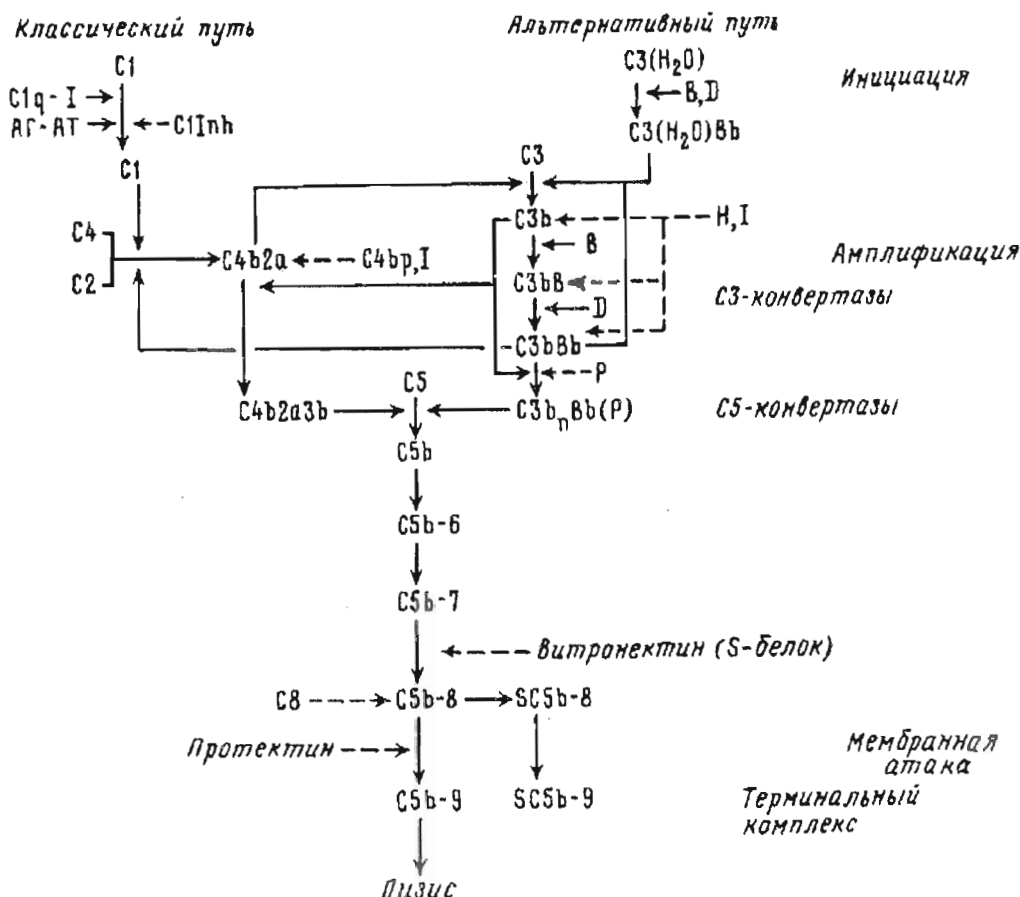
В данном обзоре сделан акцент на особенностях функционирования протеиназ системы комплемента, обусловленных необходимостью осуществления жесткого регуляторного контроля активации системы (общеизвестные факты изложены в обзорных публикациях [1—5]).

Активация комплемента состоит из этапов инициации (узнавания), амплификации (усиления ответа) и мембранной атаки. Первые этапы включают каскад реакций ограниченного протеолиза, на каждой стадии которого происходит отщепление фрагмента молекулы компонента, а остающийся фрагмент участвует в последующей стадии. Следует отметить, что процесс активации является в биологическом смысле «безотходным производством», поскольку все образующиеся в ходе протеолитической деградации фрагменты обладают физиологической активностью.

---

Сокращения: АГ — антиген, АТ — антитело, ЕА — эритроциты барана, сенсibilизированные кроличьими антителами. Аминокислоты, кроме особо указанных, L-ряда.

Активация и регуляция системы комплемента



Инициация классического пути начинается со связывания на активаторе первого компонента комплемента (C1), представляющего собой комплекс трех белков — C1q, C1r и C1s. За узнавание активатора ответствен субкомпонент C1q. Основным активатором классического пути является комплекс антиген — антитело (АГ — АТ), образованный иммуноглобулинами классов G и M, причем в случае IgG необходимо, чтобы в комплексе были рядом расположены по крайней мере две молекулы иммуноглобулина. В настоящее время обнаружено, что классический путь может инициироваться и антитело-независимым образом (путем связывания с C1-компонентом некоторых фрагментов клеточных стенок бактерий, митохондрий, клеток миокарда, холестеринсодержащих липидов, адипоцитов, РНК-вирусов, комплексов С-реактивного белка). Один из ярких примеров этого — запуск системы комплемента эндотоксином менингококка (что является основной причиной летального исхода при менингите, поскольку липополисахарид микроорганизма эффективно связывается с клетками менингеальной оболочки мозга).

Молекула IgM представляет собой пентамер субъединиц, каждая из которых имеет участок связывания C1, расположенный в C<sub>μ</sub>4-домене Fc-фрагмента иммуноглобулина. При этом молекула IgM способна связать одну молекулу C1q. Связывающая способность IgM существенно возрастает, когда антитело соединено

## Ингибирование пептидами связывания C1q с иммунными комплексами

Пептид	K <sub>i</sub> , мМ	Относительная эффективность ингибитора
ВосTrpTyr	0,286 ± 0,053	100
ВосTyrTrp	2,70 ± 0,45	11
TrpTyr	1,93 ± 0,55	15
ВосTrpPhe	>3 (не ингибирует)	0 (<10)
ВосDTyrDTyr	>3,7 (не ингибирует)	0 (<8)
ВосLeuLeu	3,60 ± 0,41	8
ВосPheTyr	1,81 ± 0,36	16
AcPheTyr	0,96 ± 0,03	30
ThrLysProArg (тафцин)	0,60 ± 0,13	48
ВосGluValAspLeuLeuLysAspGlyOме	0,47 ± 0,06	61

со своим антигеном, благодаря значительным изменениям в пространственной структуре IgM, приводящим к некоторому сближению доменов, фиксирующих комплемент. Активация комплемента происходит только при взаимодействии с иммунным комплексом.

Участок связывания C1q в молекуле IgM до последнего времени является предметом споров. Высказана гипотеза об участии в связывании комплемента остатков Trp<sup>277</sup> и Tyr<sup>278</sup> C<sub>1</sub>2-домена иммуноглобулина G. Было исследовано ингибирование пептидами, имитирующими фрагмент Trp<sup>277</sup> — Tyr<sup>278</sup> в IgG, а также белками, содержащими последовательности, гомологичные этому участку связывания C1q с иммунными комплексами (EA — эритроциты барана, сенсibilизированные кроличьими АТ) [6, 7].

Анализ полученных данных (табл. 1) показывает, что дипептиды, образованные L-аминокислотами, оказывают ингибирующее действие на связывание C1q с иммунными комплексами. Наиболее эффективным ингибитором оказался ВосTrpTyr, имитирующий участок 277—278 в IgG человека.

Оставался нерешенным вопрос о том, имитирует ли связывание пептидов специфическое взаимодействие C1q с IgG. Если такое взаимодействие функционально, то в определенных условиях можно было бы ожидать, что связывание пептида с C1q может инициировать запуск классического пути активации комплемента. Для проверки этого положения были использованы нерастворимые в воде пептиды — ZTrpTyrOме и ВосDTyrDTyrOме. Было найдено, что на твердой фазе происходила активация комплемента сыворотки — наблюдалось потребление во времени компонентов C4, C2 и C3, причем потребление C4 обгоняло потребление C2, а потребление C3 происходило еще медленнее, т. е. именно в последовательности каскада активации комплемента. Кроме того, при такой активации проявлялась стереоспецифичность.

Анализ специфичности иммуноглобулинсвязывающего центра C1q показывает, что она весьма близка специфичности, проявляемой пепсином в отношении гидролиза его субстратов. При сопоставлении аминокислотных последовательностей пепсина (Peps) и А-цепи C1q (A-C1q) в глобулярной части А-цепи обнаруживается последовательность, гомологичная последовательности вблизи Asp<sup>32</sup> активного центра пепсина:

## ПЕПСИН СВИНЬИ

32

Peps	Thr	Val	Ile	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Pro	Ser
A-C1q	Val	Val	Ile	Phe	Asp	Thr	Val	Ile	Thr	Asn	Gln	Glu	Glu	Pro	Tyr

132

А-цепь субкомпонента C1q

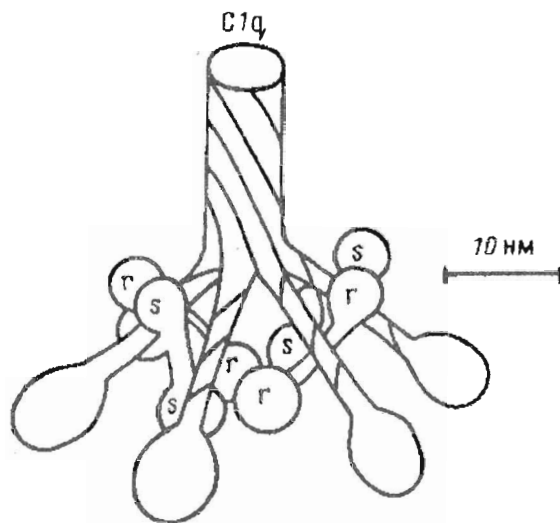


Рис. 1. Модель комплекса C1

Мало вероятно, что этот факт случайный. Он позволяет во всяком случае высказать предположение о возможном участии этой последовательности в формировании сорбционного центра C1q и о сходстве в построении сорбционных участков этих белков.

Подклассы IgG обладают различной аффинностью к C1q: у человека это ряд  $IgG3 > IgG1 > IgG2$ . Что касается IgG4, то он, хотя и связывается с C1q (менее эффективно, чем другие IgG), не активирует классический путь. На этом этапе активации известны (но весьма мало изучены) два регулятора — ингибиторы C1q, блокирующие его связывание с инициатором: растворимый C1q-I и мембранный M-C1q-I.

Белок C1q имеет уникальную структуру. Он состоит из 6 комплексов А-, В- и С-цепей, содержащих по 200 аминокислотных остатков каждая. Дисульфидными связями объединены попарно А- и В-, а также С- и С-цепи. Между цепями обнаруживается высокая степень гомологии. Они содержат на N-конце от 2 до 8 остатков, образующих неколлагеновую структуру, затем 78 остатков коллагеноподобной части и 103—108 остатков С-концевой структуры. Каждая тройка цепей (А, В и С) образует в своей коллагеновой части тройную спираль, а на С-конце цепей — общую глобулярную структуру. В середине коллагеновой части каждой цепи имеется нарушение упорядоченной структуры, что, по-видимому, отвечает за изгиб тройной спирали и обеспечивает некоторую сегментальную подвижность молекулы. Попарно такие субъединицы объединены S—S-связями между С-цепями, а 6 субъединиц образуют полную структуру молекулы C1q, которая в электронном микроскопе наблюдается в виде «букета тюльпанов» (рис. 1). Начала 6 коллагеновых жгутов сплетены (с некоторой перевитостью) в центральную связку, затем стебли под небольшим углом расходятся и каждый из 6 стеблей несет на своем конце (С-концевые фрагменты) «головку тюльпана». Головки и являются частями молекулы, ответственными за связывание с инициаторами активации. На каждой головке предполагается наличие от 1 до 3 активных участков связывания.

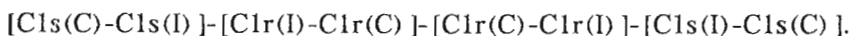
Было показано [8], что для активации C1 достаточно связывания C1q с двумя молекулами IgG, при этом активация C1r происходит вследствие конформационных изменений молекулы C1q. Таким образом, способность к конформационным изменениям молекулы C1q может являться основным функционально важным свойством этого субкомпонента. Поскольку известно, что струк-

турная подвижность молекулы белка, как правило, тесно связана с пониженной устойчивостью к денатурирующим воздействиям [9], можно ожидать структурной неустойчивости молекулы Clq и способности ее к спонтанной инактивации, что и было обнаружено [10].

Данные электронной микроскопии воссоздают поэтапную картину изменений ультраструктуры и деградации молекулы Clq в разбавленных растворах, приводящих к ее инактивации.

Связывание компонента Cl, в состав которого входят еще два субкомпонента — Clr и Cls, может приводить к активации ферментативной активности этих двух зимогенов (неактивных предшественников) протеиназ трипсिनového типа. Их активация сопровождается расщеплением молекул (что типично для протеолитических ферментов) без освобождения фрагментов, остающихся связанными дисульфидными связями. Clr является димером как в присутствии, так и в отсутствие ионов Ca<sup>2+</sup>, а Cls димеризуется только в присутствии кальция. Ионы кальция необходимы для образования комплекса Cl, состоящего из одной молекулы Clq и тетрамера Cl<sub>2</sub>S<sub>2</sub>.

Структура тетрамера Cls-Clr-Clr-Cls, в которой каждая молекула представляет «гантель» из каталитического (C) и контактного (I) доменов, может быть изображена так:



Показано, что зимогенная форма такого тетрамера связывает 4 иона кальция, а активированная — 5. На основании совокупности изученных свойств молекул Cl предложена модель, согласно которой протяженная гирлянда доменов тетрамера переплетает коллагеновые стебли Clq таким образом, что каталитические домены Clr и Cls оказываются сближенными внутри пространственного угла, образованного стеблями молекулы Clq (рис. 1).

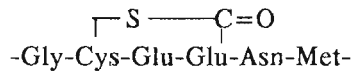
Димер Cl<sub>2</sub>, лишенный ионов кальция, способен к аутоактивации. В то же время Cls активируется только извне (активным Clr). Активация Cl при его взаимодействии с иммунными комплексами связана, скорее всего, со сближением «головок тюльпанов» при взаимодействии с кластером IgG или пространственно сближенными комплементсвязывающими доменами IgM в иммунном комплексе, что приводит в свою очередь к сближению каталитических доменов Clr и Cls, активирующих друг друга.

Методом аффинной хроматографии на иммуноглобулине G, ковалентно связанном с модифицированным макропористым стеклом (IgG-стекло) [11], разделены все субкомпоненты Cl и исследован механизм его активации. Принципиальная новизна метода состояла в том, что после связывания на IgG-стекле первого компонента комплемента проводили его активацию прогреванием колонки в течение 40 мин при 30° C, после этого с колонки элюируется активированный Cl<sub>2</sub>, затем в присутствии EDTA — активированный Cls и после изменения pH и ионной силы элюирующего раствора — Clq. Полученные данные по ступенчатому элюированию с IgG-стекла субкомпонентов Cl после их активации позволяют рассмотреть гипотетический механизм активации комплекса Cl. В принятой в настоящее время молекулярной модели комплекса Cl каталитические домены Cl<sub>2</sub> сближены между собой и каждый из них — с каталитическим доменом каждой из двух молекул Cls. Естественно допустить, что при аутокаталитической активации Cl<sub>2</sub> происходит конформационный переход молекулы зимогена, приводящий к появлению у него ферментативной активности. Данная форма молекулы зимогена способна активировать вторую молекулу Clr путем ограниченного протеолиза. Такой механизм аутоактивации справедлив для многих протеиназ, он, в частности, был доказан автором для активации пепсиногена с промежуточным обратимым образованием ферментативно активной формы зимогена. Взаимодействие каталитических доменов димерной молекулы Cl<sub>2</sub> после диссоциации из комплекса Cl довершает процесс активации. Что касается ак-

тивации C1s, то в комплексе C1 активируется, по-видимому, только та молекула, которая находится рядом с активированным доменом C1r, вторая же молекула, C1s, находящаяся рядом с доменом C1r, не успевшим проактивироваться, может оставаться в зимогенной форме. После диссоциации из комплекса в отсутствие ионов  $Ca^{2+}$  C1s и C1s находятся в виде мономеров. Поэтому во фракции C1s обнаружено наличие неактивированных зимогенных молекул, способных к дальнейшей активации с помощью C1r<sub>2</sub>.

Регулятором на этом этапе активации является C1Inh (ингибитор «C1-эстеразы») — ингибитор трипсиновых протеиназ, блокирующий также активность других сериновых протеиназ крови — плазмина, калликреина, фактора Хагемана, XI фактора свертывания крови и т. д. C1Inh прочно связывается каталитическими доменами активированных C1r и C1s и способен контролировать процесс дальнейшей активации каскада комплемента. Наследственный дефицит этого ингибитора приводит к заболеванию, проявляющемуся в виде ангионевротического отека.

Если единственным субстратом активированного C1r является C1s, то у активированного C1s уже два субстрата — компоненты C4 и C2. Первым активируется C4, поскольку расщепление C2 в присутствии активированного C4 протекает во много раз быстрее, чем расщепление одного C2, и, кроме того, активация одного C2 не приводит к дальнейшему продолжению каскада активации комплемента. При активации C4 от α-цепи трехцепочечного белка отщепляется N-концевой 77-членный пептид C4a, проявляющий свойства анафилатоксина. Характерная особенность компонентов C4 и C3 (а также сывороточного ингибитора протеиназ α<sub>2</sub>-макрोगлобулина) — наличие в структуре молекулы необычной тиолсложноэфирной связи:



Эта последовательность обычно скрыта в гидрофобном окружении нативной молекулы и недоступна воде. При активации соответствующего белка (т. е. при отщеплении N-концевого фрагмента C4a или C3a) происходит конформационная перестройка остающегося фрагмента (C4b или C3b) и эта тиолсложноэфирная связь становится доступной растворителю. Будучи пространственно расположенной рядом со связывающим участком молекулы, узнающим определенные структуры (см. ниже), характерные для молекул иммуноглобулинов и клеточной стенки бактерий, тиолсложноэфирная связь вместе с этим участком представляет собой подобие «активного центра» метастабильного активированного фрагмента. Метастабильность объясняется тем, что активированная связь тотчас же подвергается нуклеофильной атаке водой, а также любым нуклеофилом, в ней растворенным. Однако активированный фрагмент благодаря своему узнающему участку предпочитает связываться на клетке или иммуноглобулине (вероятно, на Fab-фрагменте последнего), причем такое связывание за счет ацилирующего действия активированной группы становится ковалентным.

Компонент C2 обратимо связывается с C4b в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  и активируется ферментом C1s. При этом происходит его расщепление на два фрагмента: C2a (73 кДа) и C2b (34 кДа). Роль фрагмента C2b пока не вполне ясна. Предполагается, что он остается связанным с комплексом C4b2a, упрочивая подобную протеиназу и в Mg-зависимом комплексе C4b2a функционирует в виде фермента — C3-конвертазы, субстратом которого является компонент C3. Процесс контролируется C4-связывающим белком (C4bp), который, связываясь с C4b, мешает посадке C2 или разрушает конвертазу C4b2a. Будучи связанным с C4b, этот белок становится кофактором инактивирующего фактора I (сериновой протеиназы трипсинового типа, гидролизующей α-цепи в C4b и C3b). Кофакторную

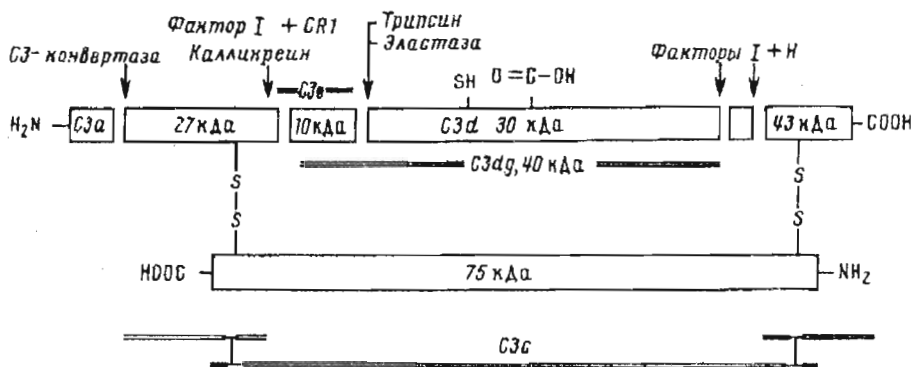


Рис. 2. Структура и протеолиз молекулы компонента С3

роль для действия фактора I может осуществлять мембранный гликопротеин CR1, рецептор фрагментов C4b и C3b. Регулирующую роль играет также фактор, ускоряющий распад конвертазы (DAF), найденный на мембранах эритроцитов, тромбоцитов и всех типов лейкоцитов. Связываясь с C2b (или Bb в альтернативном пути), DAF ускоряет распад конвертаз, а связываясь с C4b или C3b, предотвращает их образование.

С3-конвертаза активирует третий компонент комплемента, отщепляя с N-конца  $\alpha$ -цепи молекулы 77-членный пептид — С3а, обладающий, как и С4а, анафилактической активностью. Второй фрагмент протеолиза, С3b, метастабилен; он теряет способность связываться, если не успевает иммобилизоваться, за счет активированной в виде тиолсложноэфирной связи карбоксильной группой, рядом с комплексом C4b2a. В этом случае он подвергается дальнейшему протеолизу фактором I в присутствии фактора Н (играющего кофакторную роль) с образованием iC3b, а также другими протеиназами крови с образованием различных физиологически активных пептидов (рис. 2).

Иммобилизованный С3b образует С5-конвертазу — C4b2a3b. Этот новый фермент также имеет свой единственный субстрат — компонент С5 — двухцепочечный белок, во многом подобный (и гомологичный) компоненту С3. Однако в отличие от С3 тиолсложноэфирная связь у него отсутствует. От N-конца  $\alpha$ -цепи С5 при активации отщепляется 74-членный углеводсодержащий пептид С5а, обладающий очень сильной анафилактической активностью, а также способностью вызывать хемотаксис.

Образование анафилатоксинов С4а, С3а и в особенности С5а в ходе активации комплемента приводило бы к весьма неприятным последствиям (в случае С5а — к смертельному исходу), если бы не контролировалось ферментом крови — карбоксипептидазой N, которая у всех этих анафилатоксинов отщепляет С-концевой аргинин и тем самым лишает их физиологической активности (впрочем, у С5а-desArg сохраняется хемотаксическая активность). Анафилатоксины в их активной форме связываются с рецепторами на тучных клетках, что приводит к выбросу гистамина и других биологически активных аминов, увеличению проницаемости сосудистой стенки и сокращению гладкой мускулатуры.

Остающийся фрагмент молекулы С5b является инициатором самосборки мембраноатакующего комплекса, называемого иногда терминальным комплексом комплемента. С5b в растворе связывает компоненты С6 и С7 с образованием тримолекулярного комплекса С5b67, в котором формируется участок связывания мембран или других гидрофобных поверхностей. Связавшись с мембраной, этот комплекс становится стабильным, присоединяет компонент С8 (при этом повышается проницаемость мембраны для низкомолекулярных веществ, что может приводить к слабому лизису), и новый тетрамолекулярный комплекс катализирует связывание и встраивание в мембрану нескольких (от 12 до 21) молекул ком-

понента С9. Эллипсоидальные молекулы С9 приобретают вытянутую конформацию, «прошивают» насквозь бислойную липидную мембрану и формируют тороидальный канал. Образующееся отверстие диаметром около 100 Å позволяет свободно проходить через мембрану низкомолекулярным веществам, солям, но недостаточно для прохождения белков и других высокомолекулярных соединений. В результате в клетке растет эндоосмотическое давление, клетка набухает и лопается.

Важным вопросом регуляции на этом этапе является предотвращение связывания мембраноатакующего комплекса на собственных клетках организма. Комплекс С5b67, образовавшийся вблизи С5-конвертазы, находящейся на клетке-мишени, должен иметь предпочтительность связывания с той же клеткой. Если же комплекс не связался с мембраной, он может провзаимодействовать с липопротеинами низкой плотности (LDL) или регуляторным S-белком (витронектином). Такие новые комплексы обладают способностью связывать компоненты С8 и С9, однако они не могут присоединиться к мембране, а образующиеся комплексы S-C5b-9 или LDL-C5b-9 не имеют характерной структуры мембранного канала и не могут приводить к лизису клетки. Клетки организма от лизиса собственным комплектом защищают мембранные гликопротеины, обладающие видовой специфичностью и поэтому называемые факторами гомологичной рестрикции. К ним относятся уже упоминавшийся DAF и мембранный гликопротеин протектин. Взаимодействуя с новыми экспонированными областями комплекса С5b-8 и агрегирующего С9, протектин ограничивает число молекул С9, способных связаться с комплексом, и ингибирует включение С9 в липидный бислой. Гомологичную рестрикцию осуществляет также С8-связывающий белок (С8bp). Присоединение С5b6 к клеткам ингибируется гликофорином А.

Инициация альтернативного пути активации компонента связана прежде всего со свойствами молекулы компонента С3. Как уже указывалось выше, этот двухцепочечный гликопротеин содержит в  $\alpha$ -цепи тиолсложноэфирную связь, недоступную для спонтанного гидролиза водой. Однако конформационная подвижность, присущая любому глобулярному белку в водном растворе, заставляет этот белок находиться в динамическом равновесии нативной и обратимо денатурированной «развернутой» форм. Хотя время существования развернутой конформации чрезвычайно мало, все же в каком-то числе молекул тиолсложноэфирная связь успевает подвергнуться гидролизу, после чего денатурация этих молекул становится необратимой. После расщепления лабильной связи молекулы находятся в иной, отличной от нативной конформации. Такой С3 (на схеме 1 С3(H<sub>2</sub>O)) принято называть «С3b-подобным», поскольку он способен участвовать в реакции инициации активации альтернативного пути. Спонтанная инактивация С3 протекает при 37° С со скоростью 0,5%/ч, т. е. в 1 л крови в течение 1 ч образуется 6 мг С3b-подобного компонента. Этот процесс контролируется факторами Н и I, в результате чего денатурированный С3 подвергается последовательному протеолизу, однако само наличие некоторого числа спонтанно образующихся С3b-подобных молекул, по-видимому, объясняет возможность запуска альтернативного пути.

В активации альтернативного пути участвуют две сериновые протеиназы трипсинового типа: факторы В и D. Фактор В во многом похож на компонент С2 классического пути — он играет аналогичную роль в формировании С3- и С5-конвертаз; как и компонент С2, он термоллабилен. Фактор В в зимогенной форме образует обратимый Mg-зависимый комплекс с С3b (как растворимым, так и ковалентно иммобилизованным на мишени-активаторе) или с С3b-подобным белком. Только в таком связанном виде фактор В может подвергаться протеолитической атаке со стороны фактора D. Более 90% фактора D находится в кровотоке в ферментативно активной форме [12]. Доказательства существования зимогенной формы фактора D получены в работах С. В. Андреева и А. М. Ищенко (ВНИИОЧБП, Санкт-Петербург), выделивших высокомолекулярную форму фак-



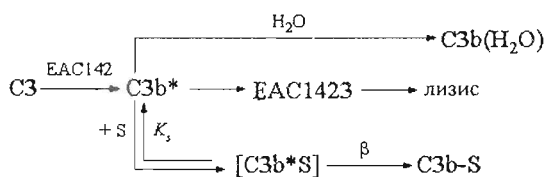
тора D. Только у новорожденных (в пуповинной крови) было найдено до 70% зимогена фактора D, у взрослых его количество не превышает 5%. Поскольку активация зимогена D может осуществляться C3-конвертазой альтернативного пути [12], существенное снижение содержания зимогенной формы у взрослых может объясняться постоянной активацией в их кровотоке альтернативного пути комплемента. (Следует при этом отметить наличие ферментативной активности у фактора В в обратимо разрывной зимогенной форме в комплексе с C3b, что может объяснить, как происходит активация «первой» молекулы зимогена).

Фактор D (мол. масса 25 кДа) обладает высокой степенью гомологии с трипсином и тем не менее проявляет чрезвычайно высокую специфичность. Для него неизвестно ни одного синтетического или природного субстрата, кроме фактора В (в комплексе с C3b или C3b-подобным белком), который он расщепляет на два фрагмента: фермент Bb (60 кДа) и Ba (33 кДа), влияющий на рост активированных В-лимфоцитов. В составе Mg-зависимого комплекса C3bBb фактор В образует C3-конвертазу. Такой фермент называют еще амплифицирующей конвертазой, поскольку он катализирует активацию компонента C3, превращая его в C3b, а последний дает начало образованию новой C3-конвертазы. Работа такого генератора с положительной обратной связью контролируется факторами Н и I. Конвертаза C3bBb уже не является обратимо диссоциирующим комплексом — распад такого комплекса ведет к необратимой инактивации конвертазы. Связывание фактора Н на C3b приводит к распаду конвертазы и, кроме того, к ферментативной деградации C3b фактором I, для которого фактор Н является кофактором. Стабилизирующую роль в сохранении активности конвертазы играет белок пропердин (Р). Пропердин в крови существует в неактивной форме. Его активация происходит в результате контакта с C3bBb и, по-видимому, обусловлена конформационными изменениями молекулы. Активированный пропердин связывается с C3b или C3b-подобным белком и способствует развитию реакции по альтернативному пути, продлевая время существования конвертазы.

Образующийся метастабильный активированный C3b, в котором еще не успела расщепиться тиолсложноэфирная группировка, способен связываться с подходящими нуклеофильными акцепторами, в том числе и на поверхности клетки или других частиц. Такой иммобилизованный C3b дает начало образованию твердофазной (или мембранной) C3-конвертазы. Будет ли данный объект активатором альтернативного пути, во многом зависит от свойств поверхности: если поверхность благоприятствует связыванию фактора Н (как это часто происходит на мембране клеток, покрытых сиаловыми кислотами), то такая поверхность не может быть активатором благодаря контролирующей функции фактора Н. Кроме того, ряд мембранных белков выполняют функции гомологичной рестрикции, способствуя распаду конвертаз, связываясь с C3b и выступая в роли кофакторов фактора I. Такими регуляторами являются CR1 и DAF.

Эффекторы, реагирующие с C3b в момент его образования (классическим или альтернативным путем), обладают сильными регуляторными свойствами, поэтому среди них можно, по-видимому, обнаружить различные иммуномодуляторы и даже известные химиотерапевтические средства. Был разработан удобный метод для количественной оценки связывания активированного C3b с молекулами акцепторов [13].

Ингибирование гемолиза в результате «перехвата» C3b\* акцептором S можно описать следующей моделью:



где C3b(H<sub>2</sub>O) — неактивная форма после гидролиза тиолсложноэфирной связи,

Исследованные антикомплементарные факторы яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana*

Фактор	Молекулярная масса, кДа	Содержание в сухом яде, мг/г	Механизм действия	Аналог в яде других кобр
CFA-Ia	800	0,28	?	H-CoF
CFA-Ib	60	7,0	Инактивация C4, связывание с C4b	
CFA-Ic	3,9	2,6	Ингибитор C1s	
CFA-IIa	5,7	2,0	Инактивация C2, B	
CFA-IIb	3,2		?	
CFB-I	39	3,6	Инактивация C4, связывание с C4b и C3	CI
CFB-II (цитотоксин I)	6,8	115	Связывание с C4b	
CFB-III (цитотоксин II)	6,7	85	Инактивация C4, связывание с C3	

[C3b'S] — обратимое промежуточное сорбционное соединение C3b\* и эффектора, а C3b-S — ковалентное, гемолитически неактивное соединение, однако для придания большей общности модели полезно считать, что лишь доля  $\beta$ -молекул сорбционного комплекса превращается в эту форму. Для простоты модели предполагается, что доля молекул, превращаемая в гемолитически неактивную форму C3b(H<sub>2</sub>O), постоянна. С учетом этих допущений можно написать уравнение ингибирования реакции гемолиза, когда концентрация [S] много выше концентрации компонента C3:

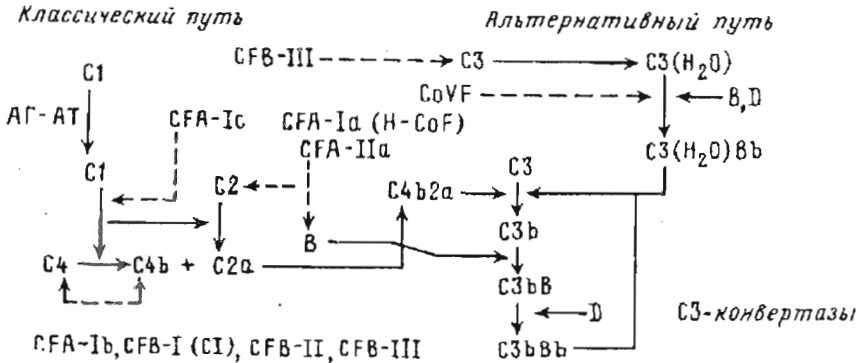
$$\alpha = \frac{\beta [S]}{K_s + [S]},$$

внешне напоминающее уравнение Михаэлиса—Ментен. Степень ингибирования  $\alpha$  рассчитывали по формуле  $\alpha = (z_0 - z_s) \cdot 100 \% / z_0$ , где  $z_0$  — число эффективных комплексов на один эритроцит в отсутствие ингибитора, а  $z_s$  — то же в его присутствии.

Было высказано предположение, что при взаимодействии нуклеофильных акцепторов с тиолсложноэфирной связью активированного фрагмента C3b важна не только нуклеофильность атакующей группы, но и специфичность взаимодействия (типа фермент—субстрат) акцептора с «активным центром» C3b, представляющим собой совокупность «каталитического участка» — ацилирующей группы и «сорбционного участка». Изучено действие в качестве ингибитора превращения C3-конвертазы в C5-конвертазу («перехватчика») бластолизина (препарата фрагментов пептидогликанов клеточных стенок *Lactobacillus bulgaricus*, обладающего противоопухолевой активностью) и других иммуномодуляторов [14].

Определенный интерес представляют иммуномодуляторы, являющиеся минимальными структурными фрагментами пептидогликанов: N-ацетилглюкозаминил-( $\beta 1 \rightarrow 4$ )-N-ацетилмурамоилаланил-D-изоглутамин (GMDP) и N-ацетилмурамоилаланил-D-изоглутамин (MDP). Действие этих иммуномодуляторов на комплемент не было ранее известно. Целесообразно было проверить также эффективность действия иммунологически неактивных углеводных фрагментов — N-ацетилглюкозаминил-(1  $\rightarrow$  4)-N-ацетилмурамовой кислоты, N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Наилучшими ингибиторами оказались GMDP и MDP, углеводы ингибируют процесс менее специфично.

Ингибирование системы комплемента факторами яда среднеазиатской кобры



Твердофазная С3-конвертаза альтернативного пути также способна связывать дополнительные молекулы С3b, превращаясь при этом в С5-конвертазу альтернативного пути — С3b<sub>n</sub>Bb(P). На этом активация альтернативного пути завершается. Далее следует активация С5 и образование терминального мембраноатакующего комплекса, что является общим для обоих путей активации.

Что характерно для активации альтернативного пути? Хотя запуск альтернативного пути может происходить и на иммунных комплексах, для активации не требуется, чтобы организм уже был знаком с инфекцией (или каким-либо чужеродным объектом) — выработка антител не обязательна, поскольку для распознавания используются другие (хотя и менее специфичные) приемы. Вследствие этого возрастает возможность ошибочной активации. Вероятно, поэтому альтернативный путь активации менее мощный по сравнению с классическим.

Существование двух путей активации комплемента отнюдь не означает, что всегда активируется лишь один из путей. Как было уже сказано выше, классический путь может запускаться антитело-независимым образом (при этом может активироваться и альтернативный путь). Иммунные комплексы, являющиеся, как правило, активаторами классического пути, могут инициировать и альтернативный путь. При активации классического пути в результате действия классической С3-конвертазы образуется С3b, который с неизбежностью активирует альтернативный путь. Кроме того, было найдено, что С3-конвертаза альтернативного пути кроме активации своего естественного субстрата — компонента С3 может активировать компоненты С4 и С2, причем, как и в случае классической активации, С2 активируется в присутствии С4. Активируясь, эти компоненты образуют С3-конвертазу классического пути [15]. Таким образом, следует всегда иметь в виду, что реально функционируют оба пути активации, дополняя и усиливая друг друга.

Поиски природных эффекторов системы комплемента целесообразно проводить в продуктах секреции организмов, сталкивающихся с гетерологичной кровью и поэтому синтезирующих вещества для подавления или нейтрализации действия комплемента чужого организма. Так, для лучшего действия яда змее полезно иметь в яде эффекторы, предотвращающие активацию комплемента, которая создавала бы защитные барьеры распространению и действию яда (воспаление, отеки и т. п.). Пиявка, насосавшись крови, должна позаботиться о том, чтобы комплемент чужеродной крови не вызывал лизиса и некроза ее тканей. Действительно, в яде кобр описаны антикомплементарные факторы [16—18]. Проведенные исследования привели и к обнаружению антикомплементарных свойств секрета медичинской пиявки [19].

Исследованные антикомплементарные факторы среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* приведены в табл. 2. Два из найденных эффектора, CFA-Ia и

CFB-I,— аналоги известных из литературы факторов ядов других кобр. В перечне отсутствует наиболее активный фактор, обнаруженный в ядах других кобр, так называемый CVF — сильнейший активатор альтернативного пути, являющийся фрагментом C3b компонента C3 сыворотки крови кобры. То обстоятельство, что аналогичный фактор не был обнаружен в яде среднеазиатской кобры, можно объяснить качеством использованного сырья.

Несмотря на то что механизмы воздействия изученных факторов на комплемент человека различны (ингибирование фермента C1s, инактивация компонентов C2, C4, связывание с C4b, ингибирование посадки C2, связывание с C3), во всех случаях происходит блокирование формирования C3-конвертазы (и, в меньшей степени, C5-конвертазы или альтернативной C3-конвертазы), т. е. ключевого фермента каскада активации комплемента (схема 2). Такая кажущаяся избыточность (наличие большого числа эффекторов, по-разному блокирующих активность комплемента), — вероятно, общий принцип, реализуемый природой для обеспечения высокой надежности и эффективности воздействия.

Знание механизмов естественной регуляции системы комплемента, а также методов искусственного воздействия на нее позволило бы, во-первых, понять патогенетическую основу многих заболеваний, этиология которых неизвестна или спорна, а во-вторых, создать средства эффективной искусственной регуляции комплементостаза.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Complement System/Eds Rother K., Till G. O. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 535 p.
2. Reid K. B. M., Porter R. R.//Ann. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 433—464.
3. Schumaker V. N., Zavodsky P., Poon P. H.//Ann. Rev. Immunol. 1987. V. 5. P. 21—42.
4. Mollnes T. E., Lachmann P. J.//Scand. J. Immunol. 1988. V. 27. № 2. P. 127—142.
5. Kristensen T., D'Eustachio P., Ogata R. F., Chung L. P., Reid K. B. M., Tack B. F.//Fed. Proc. 1987. V. 46. P. 2463—2469.
6. Козлов Л. В., Сизой М. Н., Зинченко А. А., Левковский А. В.//Биохимия. 1986. Т. 51. № 5. С. 707—718.
7. Козлов Л. В., Зинченко А. А., Соляков Л. С., Сизой М. Н., Иценко А. М., Мартюшин С. В., Андреев С. В.//Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1047—1055.
8. Козлов Л. В., Сизой М. Н., Зинченко А. А., Иванов А. Е., Зубов В. П.//Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 12. С. 1629—1638.
9. Козлов Л. В.//Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 8. С. 1243—1254.
10. Козлов Л. В., Зинченко А. А., Сизой М. Н., Кретова А. Ф., Тихоненко А. С.//Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 1. С. 37—42.
11. Козлов Л. В., Шойбонов Б. Б., Иванов А. Е., Зубов В. П., Антонов В. К.//Биохимия. 1989. Т. 54. № 10. С. 1754—1760.
12. Козлов Л. В., Соляков Л. С.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 3. С. 342—348.
13. Козлов Л. В., Ростовцева Л. И., Ломака Т. С., Сутовская Н. С.//Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 762—768.
14. Козлов Л. В., Ростовцева Л. И., Ломака Т. С., Сутовская Н. С., Сорокина И. Б., Баркова Т. И.//Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 1510—1518.
15. Козлов Л. В., Чих В. П., Соляков Л. С.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 817—821.
16. Козлов Л. В., Шойбонов Б. Б.//Мол. биол. 1989. Т. 23. № 2. С. 372—378.
17. Козлов Л. В., Шойбонов Б. Б., Антонов В. К.//Биохимия. 1989. Т. 54. № 11. С. 1933—1940.
18. Шойбонов Б. Б., Козлов Л. В., Антонов В. К.//Биохимия. 1989. Т. 54. № 12. С. 2054—2060.
19. Баскова И. П., Никонов Г. И., Миркалмова Э. Г., Зинченко А. А., Козлов Л. В.//Каз. мед. журн. 1988. Т. 69. № 5. С. 334—336.

Поступила в редакцию  
14.VII.1993

*L. V. Kozlov*

PECULIARITIES OF THE COMPLEMENT PROTEINASES WORKING

*G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute  
of Epidemiology and Microbiology, Moscow*

Classical and alternative pathways of complement are considered which are stringently controlled cascades of proteolytic reactions. Peculiarities of working of various components of complement are characterized, ways are described of the regulation and inhibition of the system realized in the nature to achieve the highest reliability necessary for homeostasis.