



УДК 577.15.08

## ИНГИБИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ C5-КОНВЕРТАЗЫ КОМПЛЕМЕНТА

© 1998 г. Л. В. Козлов<sup>#</sup>, Т. В. Лебедева\*

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии  
и микробиологии им. Г.Н. Габричевского  
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10;  
\*Институт ревматологии РАМН, Москва

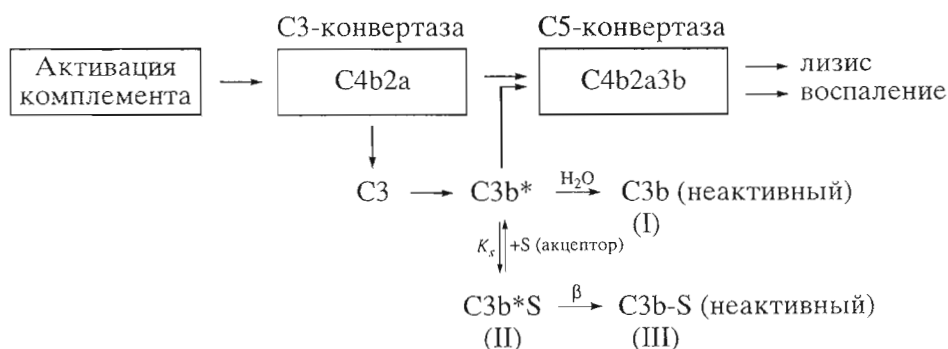
Поступила в редакцию 21.08.97 г. Принята к печати 18.01.98 г.

Важным фактором поддержания гомеостаза организма является контроль за образованием C5-конвертазы системы комплемента. Показано, что такое контролирующее действие могут осуществлять некоторые физиологически активные вещества эндогенной и экзогенной природы. Разработан метод изучения влияния эффекторов на образование классической C5-конвертазы из C3-конвертазы, стабилизированной ионами никеля. В качестве эффекторов были изучены иммуноглобулины G и M, рекомбинантные  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерфероны, серотонин, адреналин, гистамин и этанол. Для оценки физиологической значимости наблюдаемого действия эффекторов были определены константы их связывания с активированным фрагментом компонента C3 – C3b и величины максимального эффекта. Во всех случаях, кроме IgG и IgM (ревматоидного фактора), наблюдалось ингибирование образования C5-конвертазы. IgM с активностью ревматоидного фактора обнаруживал активирующее действие, а IgG не оказывал никакого влияния.

*Ключевые слова:* система комплемента; C3-конвертаза; C5-конвертаза, ингибирование; интерфероны; иммуноглобулины; серотонин; адреналин; гистамин; этанол.

При активации системы комплемента наиболее драматические события – воспаление и атака клеточных мембран – развиваются после форми-

рования C5-конвертазы, образующейся в результате присоединения активированного фрагмента C3b к C3-конвертазе [1] (схема):



Сокращения: VBS – изотонический вероналовый буфер, ЧСА – сывороточный альбумин человека, EA – сенсibilizированные эритроциты барана.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail:kozlov\_lv@orc.ru).

C3b в момент образования (C3b\*, "насцентный C3b") содержит короткоживущую экспонированную тиолсложноэфирную группировку, способную ацилировать молекулу акцептора. Эта группировка, как было нами показано ранее, находится вблизи участка узнавания акцептора [2-4]. Важным фактором поддержания гомеостаза является контроль за образованием C5-конвертазы, который в организме осуществляется различными регуляторами, принадлежащими системе комплемента. Функционирование C5-конвертазы имеет два наиболее важных следствия для организма, связанных с расщеплением компонента C5 на два фрагмента, C5a и C5b. Первый из этих фрагментов – мощный анафилактиксин, обладающий также хемотаксическими свойствами. Именно он ответствен за воспаление, в частности отеки, обусловленные выбросом гистамина из тучных клеток при связывании C5a с его рецептором. Фрагмент C5b инициирует образование мембранатакующего комплекса, осуществляющего лизис клеток, на которых он формируется. Поэтому блокирование функционирования или, что более надежно, образования C5-конвертазы должно отменять все эти эффекты. На пути формирования C5-конвертазы в каскаде активации классического или альтернативного пути комплемента имеется много регуляторов, работающих на разных стадиях. Интересно рассмотреть последний ключевой момент – превращение C3-конвертазы в C5-конвертазу, – состоящий в присоединении дополнительных молекул C3b к C4bC2a или C3bBb – соответственно C3-конвертазам классического или альтернативного путей. Такое присоединение осуществляется только с участием насцентного C3b с нерасщепленной тиолсложноэфирной связью. Вскоре после образования C3b\* происходит его инактивация в результате гидролиза или действия нуклеофильных реагентов (схема), после чего он не может участвовать в образовании C5-конвертазы. После открытия этого феномена было также найдено, что эффективность веществ, осуществляющих инактивацию насцентного C3b, связана не только с их нуклеофильностью, но и со структурными особенностями [5,6]. Ранее нами было показано, что кинетика взаимодействия эффекторов с насцентным C3b имеет двухстадийный характер: вначале происходит обратимое связывание эффектора с сорбционным участком молекулы C3b, обладающим определенной специфичностью, а затем уже осуществляется инактивация [3,4]. Вероятно, такая специфичность предопределена взаимодействием с природными эффекторами и возникла в ходе эволюции.

Образование C5-конвертазы предполагает ковалентное связывание C3b с компонентами, формирующими C3-конвертазу. На роль таких акцепторов могли бы претендовать антигены, анти-

тела (для классического пути активации – IgG или IgM) и компоненты комплемента, формирующие конвертазу, – C2a или C4b. Таким образом, эти потенциальные акцепторы могли бы выступать и как ингибиторы образования C5-конвертазы и, с другой стороны, как инициаторы альтернативного пути. В связи с этим их также полезно обследовать на способность служить акцепторами C3b.

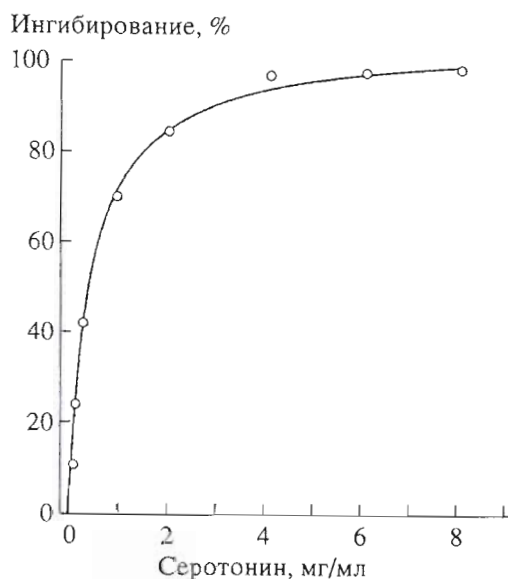
Взаимодействие C3b\* со структурами клеточных стенок бактерий, рассмотренное ранее [4], могло служить приспособительным механизмом, обусловившим выживание микроорганизмов в кровотоке хозяина. Реакция с адреноалином, обнаруженная в работе [6], приводила к предположению о запрограммированном влиянии некоторых эндогенных эффекторов организма на систему комплемента. Это создало предпосылки для изучения ингибирования комплемента другими низкомолекулярными физиологически активными веществами.

Особое внимание привлекала обнаруженная способность серотонина и иммуномодуляторов – мурамоилпептидов специфически и конкурентно взаимодействовать с клетками иммунной и нервной систем. Постулировалось их конформационное подобие, позволяющее конкурировать за один и тот же рецептор [7]. Поскольку нами было обнаружена способность мурамоилдипептидов ингибировать образование C5-конвертазы, можно было с большой вероятностью ожидать проявления подобной активности и со стороны серотонина, что характеризовало бы связь иммунной и нервной систем также и на гуморальном уровне.

Другим обстоятельством, побудившим нас вернуться к рассмотрению проблемы регуляции на уровне лимитирования образования C5-конвертазы, было обнаружение способности  $\gamma$ -интерферона акцептировать насцентный C3b, о чем косвенно можно было судить на основании инактивации интерферона активируемым компонентом при определении интерферона иммуноферментным анализом [8]. Это обстоятельство представляло тем больший интерес, что была обнаружена способность  $\gamma$ -интерферона оказывать противовоспалительное действие [9].

Для исследования ингибирования превращения C3-конвертазы в C5-конвертазу использовали модификацию метода, описанного ранее [3]. Принцип метода состоит в получении на эритроцитах барана, сенсibilизированных антителами к антигену Форсмана, (EA) мембраносвязанной C3-конвертазы (EAC142). Лизис эритроцитов в условиях дефицита C3 и достаточного количества остальных концевых компонентов системы определяется концентрацией активированного C3b, способного связаться с C3-конвертазой и образовать C5-конвертазу (EAC1423). Исследуемое ве-





Ингибирование образования C5-конвертазы серотином. Точки соответствуют экспериментальным данным, а кривая построена исходя из теоретической математической модели. Условия см. в "Экспер. части".

щество, способное к акцептированию активированных молекул C3b с нерасщепленной тиолсложноэфирной связью, ингибирует этот процесс. Вначале получали комплекс EAC14, обрабатывая EA реагентом R2, как описано ранее [10]. Затем готовили C3-конвертазу, содержащую компонент C2<sup>oxy</sup>. Известно, что окисление C2 иодом приводит к образованию более стабильной C3-конвертазы (EAC142<sup>oxy</sup>) из-за увеличения сродства C2a к C4b [11]. Высокая скорость распада C3-конвертазы, содержащей неокисленный компонент C2 ( $k = 2 \text{ мин}^{-1}$  при 37°C для жидкофазной конвертазы), существенно затрудняет работу с ней [12].

Другим фактором, позволяющим увеличить период полуинактивации C3-конвертазы, является замена ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , необходимых для образования комплекса EAC142, на ионы  $\text{Ni}^{2+}$ . Данный подход был описан ранее для получения растворимой стабилизированной C3-конвертазы в присутствии компонента C2<sup>oxy</sup> [13]. При использовании аналогичного подхода для получения мембраносвязанной стабилизированной C3-конвертазы классического пути активации на эритроцитах барана оказалось, что период полураспада такой конвертазы составляет 1 ч при 37°C и 2–3 нед при 4°C [14].

Ингибирование гемолиза в результате акцептирования C3b\* эффектором S представлено в нижней части схемы, где (I) – неактивная форма C3b, образующаяся в результате гидролиза тиолсложноэфирной связи, (II) – обратимое промежу-

точное соединение C3b\* и эффектора, (III) – ковалентное соединение C3b с эффектором, являющееся гемолитически неактивным соединением. Для придания большей общности модели полезно считать, что лишь доля  $\beta$  молекул сорбционного комплекса C3b\*S превращается в гемолитически неактивную форму. Для простоты мы также предполагали, что доля молекул, превращаемая в другую гемолитически неактивную форму C3b (H<sub>2</sub>O), постоянна. С учетом этих допущений можно составить уравнение ингибирования реакции гемолиза, когда концентрация эффектора [S] много выше концентрации компонента C3:

$$\alpha = \beta[S]/(K_s + [S]),$$

напоминающее внешне уравнение Михаэлиса-Ментен. Это обстоятельство позволило применить для определения параметров уравнения итерационный метод Уилкинсона [15]. Степень ингибирования образования C5-конвертазы ( $\alpha$ ) рассчитывали по формуле

$$\alpha = (z_0 - z_s)/z_0,$$

где  $z_0$  – число эффективных мембраноатакующих комплексов на один эритроцит в отсутствие ингибитора, а  $z_s$  – то же в его присутствии. Необходимо заметить, что в случае, когда вместо ингибирования наблюдается активация (такой пример и его причины рассмотрены далее),  $z_s > z_0$  и, значит,  $\alpha < 0$ . При этом значения  $\beta$  также следует рассматривать как отрицательные. Поэтому положительные значения  $\beta$  означают максимальную долю молекул C5-конвертазы, на которую произошло их уменьшение в результате действия эффектора, а отрицательные значения  $\beta$  – увеличение этой доли. Адекватность модифицированного метода изучения влияния эффекторов на образование C5-конвертазы была проверена на исследованных нами ранее ингибиторах этого процесса – этиловом эфире *N*-ацетил-*L*-тирозина [3] и *N*-ацетилмурамоилаланил-*D*-изоглутамине (МДП) [4]. Константы ингибирования, полученные при использовании нового метода, практически совпали с опубликованными ранее [4]. Хорошее соответствие наблюдаемого процесса ингибирования (экспериментальные точки) предложенной математической модели (теоретическая кривая) видно на рисунке на примере серотонина. Аналогичная картина наблюдалась и для других изученных акцепторов C3b\*.

Из эффекторов, влияющих на образование C5-конвертазы, были изучены иммуноглобулины G и M, рекомбинантные  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерфероны, се-

Действие эффлекторов на образование C5-конвертазы (ингибирование –  $\beta > 0$ , активация –  $\beta < 0$ )

Эффектор	$\beta$	$K_s$ , мкМ	Эффектор	$\beta$	$K_s$ , мкМ
IgM (нормальный)	$1.44 \pm 0.01$	$1.12 \pm 0.02$	Серотонин	$1.13 \pm 0.04$	$2.78 \pm 0.33$
IgM (ревматоидный фактор)	$-1.23 \pm 0.11$	$0.73 \pm 0.18$	Адреналин	$0.57 \pm 0.06$	$0.30 \pm 0.07$
$\alpha$ -Интерферон	$0.90 \pm 0.06$	$0.133 \pm 0.025$	Гистамин	$1.00 \pm 0.01$	$0.71 \pm 0.25$
$\gamma$ -Интерферон	$0.89 \pm 0.06$	$0.94 \pm 0.17$	Этанол	$1.12 \pm 0.06$	$173 \pm 36$

серотонин, адреналин, гистамин и этанол. Полученные константы взаимодействия приведены в таблице.

Активным акцептором насцентного C3b\*, как и следовало ожидать, оказался иммуноглобулин M. Ингибирование иммуноглобулином G не было нами обнаружено. Это свидетельствует о том, что IgM является несравненно более эффективным акцептором C3b\*. В недавней работе по изучению ингибирования активации комплемента, о которой судили по потреблению C4, IgM также выступал как в 1000 раз более эффективный ингибитор, чем IgG [16]. Если в наших опытах использовался IgM, выделенный из плазмы больного серопозитивным ревматоидным артритом, то вместо ингибирования гемолиза мы наблюдали активирование с той же константой диссоциации. Известно, что при серопозитивном ревматоидном артрите в крови больных содержится ревматоидный фактор, представляющий собой IgM-антитела к IgG. В опыте мы использовали эритроциты, сенсibilизированные IgG-антителами. Посадка на них IgM-антител с активностью ревматоидного фактора могла приводить к более эффективному связыванию C3b\* на поверхности клеток, а не в свободном объеме, что в конечном итоге должно было сопровождаться усилением лизиса клеток-мишеней, а не ингибированием. Может быть, в этом и состоит патологичность ревматоидного фактора, усиливающего воспаление и способствующего поражению собственных клеток организма. Именно при ревматоидном артрите существенно повышена активность компонентов комплемента, что приводит к развитию системных проявлений этого заболевания [17].

Один из компонентов дисбаланса иммунного ответа при ревматоидном артрите – снижение выработки  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферонов лейкоцитами и лимфоцитами [18-20]. Данный факт служит патогенетическим обоснованием для применения препаратов интерферона человека в лечебных целях. Нами была исследована способность препаратов интерферона человека ингибировать активацию комплемента на уровне образования C5-конвертазы. Значения констант связывания интерферонов с активированным C3b (таблица)

близки полученным для IgM. Хотя они лежат за пределами физиологических значений концентрации сывороточного интерферона, феномен связывания активированного C3b с интерфероном может играть важную физиологическую роль, как ограничивая каскадные реакции комплемента при лечении ревматических заболеваний внутривенным введением рекомбинантных интерферонов, так и инактивируя избыточное количество интерферона ( $\gamma$ -интерферон, связанный с C3-компонентом, не обладает функциональной активностью [8]) при его индуцировании вирусами. Можно предположить, что описанное в литературе усиление биосинтеза компонента C3 под влиянием интерферона объясняется изученным нами механизмом образования его комплекса с C3b.

Константы связывания с C3b\* серотонина, адреналина и гистамина (таблица) также находятся вне области нормальных физиологических концентраций этих веществ. Тем не менее важно отметить, что эти медиаторы могут элиминироваться при их высоких концентрациях с помощью комплемента и, с другой стороны, участвовать в регуляции самой системы комплемента. Участие же в этом процессе серотонина показывает, что не только на клеточном уровне, но и на гуморальном может существовать связь иммунной и нервной систем.

Наконец, самой неожиданной оказалась способность этанола ингибировать образование C5-конвертазы. Хотя пероральное введение этого вещества в организм не является необычным в таких небольших количествах, тем не менее механизмы детоксикации не позволяют достигать в кровообращении концентрации, сопоставимой с полученной константой (соответствующей 1% концентрации по объему). Однако обнаруженный феномен может вполне объяснять локальное противовоспалительное действие спирта при его местном применении (например, в виде компрессов).

Мы полагаем, что изученная реакция ингибирования образования C5-конвертазы может быть полезна при первичном скрининге различных но-



вых физиологически активных соединений, включая противовоспалительные средства.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали изотонический вероналовый буфер (VBS); VBS, содержащий ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{VBS}^{2+}$ ); буфер  $\text{VBS}^{2+}/\text{ЧСА}$ , содержащий 1 мг/мл сывороточного альбумина человека; VBSE (с 50 мМ EDTA); гистамин, адреналин, серотонин (все реагенты – фирмы Serva, Германия); этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (Sigma, США). Реагенты R2, R3,  $\text{R3}^{\text{oxy}}$  готовили по стандартным методикам [10]. В качестве интерферона применяли препараты рекомбинантных интерферонов  $\alpha 2\text{b}$  и  $\gamma$  (Biofa, Литва).

Для расчета констант в уравнении Михаэлиса–Ментен применяли компьютерную программу, реализуемую ООО “Кипко” при МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского.

#### Ингибирование образования С5-конвертазы.

Для получения комплекса ЕАС14 к 10 мл стандартной суспензии ЕА ( $1.5 \times 10^8$  клеток/мл, в условиях полного лизиса  $A_{412} = 1$ ) добавляли 100–400 мкл реагента R2, перемешивали и инкубировали 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали охлаждением до 0°C. Комплекс отмывали 3 раза  $\text{VBS}^{2+}/\text{ЧСА}$  с центрифугированием и стандартизировали по гемолизу ( $A_{412}$ ). После этого к 6 мл суспензии ЕАС14 при 0°C добавляли 180 мкл реагента  $\text{R3}^{\text{oxy}}$ , 30 мкл 0,1 М  $\text{NiSO}_4$  и инкубировали 5 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 4 мл холодного VBSE, отмывали 3 раза VBSE и стандартизировали по гемолизу ( $A_{412}$ ). 200 мкл суспензии ЕАС14 $^{\text{oxy}}$  (вносили в последнюю очередь) инкубировали 30 мин при 37°C и периодическом перемешивании с С3-компонентом комплемента (1–10 мкл) в присутствии различных концентраций изучаемого ингибитора и 50 мкл реагента R3 (в качестве источника С5-С9-компонентов комплемента). Источником С3-компонента комплемента служила сыворотка крови человека, количество которой было подобрано так, чтобы величина  $A_{412}$  (контроль лизиса) составляла около 0,7. Конечный объем реакционной смеси равнялся 500 мкл за счет добавления необходимого количества VBSE и растворов изучаемых эффекторов. После инкубации в каждую пробу добавляли 2,5 мл охлажденного до 0°C 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли степень гемолиза по величине  $A_{412}$  супернатанта. В опытах по влиянию эффекторов на образование С5-конвертазы их растворы в VBSE добавляли в реакционную смесь перед внесением ЕАС14 $^{\text{oxy}}$ . Для каждой пробы рассчитывали эффективное число гемолитически активных мембраноатакующих комплексов на один эритроцит по формуле

$z = \ln[(A_{\text{л}} - A_{\text{ЕА}})/(A_{\text{л}} - A_{\text{оп}})]$ , где  $A_{\text{л}}$ ,  $A_{\text{ЕА}}$  и  $A_{\text{оп}}$  – значения поглощения при 412 нм в контроле на полный лизис, в контроле на ЕА и в опыте.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vogt W., Schmidt G., von Buttlar B., Dieminger L. // Immunology. 1978. V. 34. P. 29–40.
2. Козлов Л.В. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 229–241.
3. Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С., Сутовская Н.С. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. С. 762–768.
4. Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С., Сутовская Н.С., Сорокина И.Б., Баркова Т.И. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. С. 1510–1518.
5. Shin H.S., Mayer M.M. // Biochemistry. 1968. V. 7. P. 3003–3006.
6. Sim R.B., Twose T.M., Paterson D.S., Sim E. // Biochem. J. 1981. V. 193. P. 115–127.
7. Silverman D.H.S., Karnovsky M.L. // Adv. Enzymol. 1989. V. 62. P. 203–226.
8. Van der Meide P.H., de Labie M.C.D.C., Wubben J.A.M., Borman A.H. // J. Immunoassay. 1991. V. 12. P. 62–82.
9. Duff G. // Rev. Esp. Reumatol. 1993. V. 20 (suppl.1). P. 571–572.
10. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П., Молчанова Н.Н. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. С. 652–659.
11. Kerr M.A., Parkers C. // Biochem. J. 1984. V. 219. P. 391–399.
12. Kerr M.A. // Biochem. J. 1980. V. 189. P. 173–181.
13. Thielens N.M., Colomb M.G. // Eur. J. Immunol. 1986. V. 16. P. 617–622.
14. Козлов Л.В., Шойбонов Б.Б. // Молекулярная биология. 1989. Т. 23. С. 372–378.
15. Wilkinson G.N. // Biochem. J. 1961. V. 80. P. 324–332.
16. Miletic V.D., Hester C.G., Frank M.M. // J. Immunol. 1996. V. 156. P. 749–757.
17. Козлов Л.В., Кудряшова Л.П., Иванова И.В. // Клиническая медицина. 1994. № 5. С. 43–47.
18. Franchimont P., Reuter A., Vrindts-Gevaert Y., Bastings M., Malaise M., Sondag C., Frere M.C., Gysen P. // Scand. J. Rheumatol. 1988. V. 17. P. 203–212.
19. Sadouk M., Vaquero C., de la Tour B., Amor B., Toubert A. // Clin. Immunol. Immunopathol. 1990. V. 56. P. 37–45.
20. Kita M., Shiozawa S., Yamaji M., Kiton I., Kishida T. // J. Clin. Lab. Anal. 1991. V. 5. P. 238–241.

## Inhibition of the Formation of Complement C5-Convertase

L. V. Kozlov\*# and T. V. Lebedeva\*\*

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

\*\**Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 34, Moscow, 115522 Russia*

Control of the formation of complement C5-convertase is an important factor in maintaining human homeostasis. Some physiologically active endogenous and exogenous substances were shown to be capable of exerting such control. A method was developed for studying the influence of the effectors on the formation of classical-complement-pathway C5-convertase from C3-convertase stabilized by nickel ions. Immunoglobulins G and M, recombinant  $\alpha$  and  $\gamma$  interferons, serotonin, epinephrine, histamine, and ethanol were studied as effectors. The binding constants of the effectors with C3b, the active C3 component, and the values of the maximal effect were determined to evaluate the physiological importance of the effectors. The inhibition of C5-convertase generation was observed in all cases except for IgG and IgM (rheumatoid factor), which showed no effect and activating effect, respectively.

*Key words: complement system, C3 convertase; C5 convertase, inhibition; interferons; immunoglobulins; serotonin; epinephrine; histamine; ethanol*

# *To whom correspondence should be addressed (e-mail: kozlov\_lv@orc.ru).*