



УДК 577.15.08

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ПОЛИАНИОНАМИ И ПОЛИКАТИОНАМИ АКТИВАЦИИ ПЕРВОГО КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА

© 2003 г. О. О. Бурделев*, А. П. Каплун*, Л. В. Козлов***, С. В. Лысакова**, В. Л. Дьяков**, В. И. Швец*

* Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва;

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

Поступила в редакцию 11.01.2002 г. Принята к печати 15.05.2002 г.

Установлено, что полиэтиленимин (50 кДа, PEI) и полиметакриловая кислота (200 кДа, PMA) ингибируют лизис эритроцитов барана, вызванный комплектом морской свинки. Подавление гемолиза на 50% наблюдается при концентрациях – PEI 0.47 и PMA 0.89 мкг/мл. Ингибирование связывания субкомпонента C1q комплемента человека с сенсibilизированными антителами эритроцитами барана (EA) зависит от того, с каким из участников реакции связывания проводили предварительную инкубацию ингибиторов. При одновременной инкубации ингибитора, C1q и EA константы ингибирования для PEI и PMA составляли соответственно 17 ± 6 и 8.1 ± 0.1 мкг/мл. Предварительная инкубация EA с PEI с последующей отмывкой ингибитора дала константу ингибирования 22 ± 3 мкг/мл. При аналогичной преинкубации EA с PMA ингибирование не наблюдалось. При добавлении ингибиторов после образования комплекса C1q с антителами также не было ингибирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что поликатионы (PEI) связываются с антителами, препятствуя образованию их комплекса с C1q, а полианионы (PMA), связываясь с активным центром C1q, препятствуют его взаимодействию с иммуноглобулинами. Кроме того, в изученном пределе концентраций не наблюдалось блокирования дальнейшего связывания C1q с ферментами C1r-C1s.

Ключевые слова: система комплемента; субкомпонент C1q; механизм ингибирования; полиэтиленимин; полиметакриловая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

В основе активации комплемента по классическому пути лежит взаимодействие субкомпонента C1q первого компонента комплемента с Fc-фрагментами иммуноглобулинов, в частности с C_H2-доменом IgG [1]. Полагают [2], что не последнюю роль в таком связывании играют заряд-зарядовые взаимодействия, поскольку белок C1q обладает очень высокой изоэлектрической точкой – 9.3 [3], в то время как изоионная точка иммуноглобулинов лежит в области нейтральных или слабокислых pH (она разная для разных индивидуальных клонов иммуноглобулинов). Эта особенность молекулы C1q является причиной связывания со многими акцепторными молекулами анионной природы [3]. Так, известно действие сурамина и гепарина, ингибирующее активность комплемента [2]. Недавно иммуноферментным

методом были определены константы взаимодействия этих лекарственных веществ с C1q [4]. Кроме того, ранее было описано ингибирование комплемент-индуцированного гемолиза отрицательно заряженными липосомами, состоящими из фосфатидилхолина и цереброзидсульфата [5].

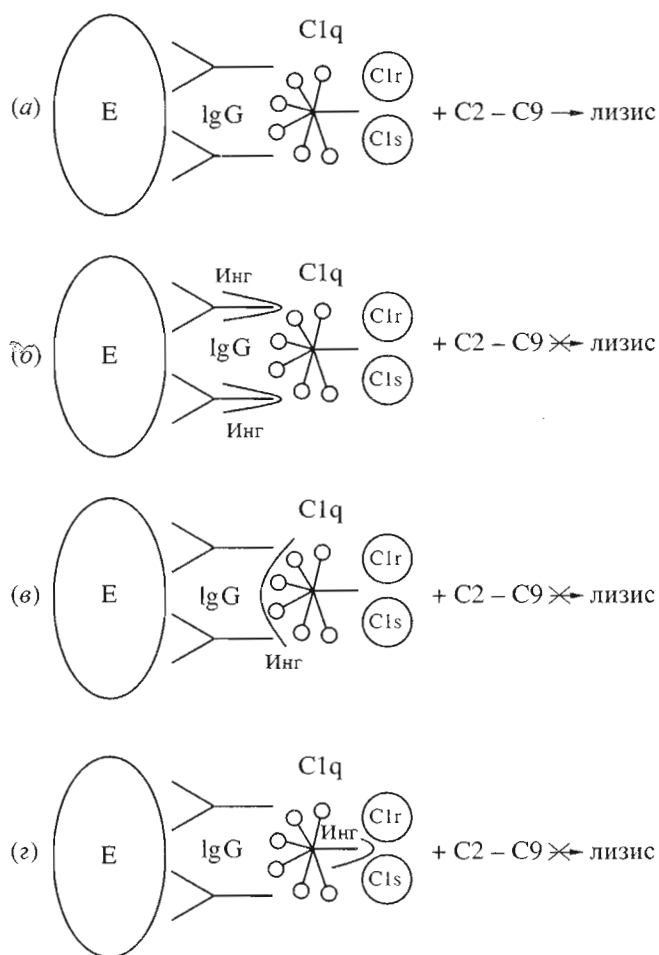
Поликатионы также ингибируют активацию комплемента. В работе Луза и др. [3] было показано, что полилизин и 1.4-диаминобутан мешают образованию комплекса C1q-IgG. Однако Виллиерс и соавт. [6] полагают, что диамины и лизин ингибируют активацию комплемента, вызывая диссоциацию компонента C1 на C1q и C1r₂s₂. Следует отметить, что иммуноглобулины, как мишень для связывания ингибиторов, в реакции взаимодействия антител с первым компонентом комплемента не рассматривались.

Таким образом, из данных литературы следовало, что полизаряженные соединения, способные ингибировать активацию комплемента, мешают образованию комплекса C1q либо с иммуноглобулинами, либо с C1r₂s₂. Кроме того, можно предположить, что в первом случае они это могут делать, связываясь преимущественно либо с C1q, либо с иммуноглобулинами.

Цель данной работы – установить, какое из рассмотренных взаимодействий в случае полика-

Сокращения: EA – эритроциты барана, сенсibilизированные кроличьими антителами против них; EAC1q – комплекс C1q с EA; PEI – полиэтиленимин; PMA – полиметакриловая кислота; R1q – сыворотка, лишенная C1q и содержащая все остальные компоненты комплемента; VBS²⁺ – изотонический вероналовый буфер, pH 7.4, содержащий ионы Ca²⁺ и Mg²⁺.

Автор для переписки (эл. почта: l.v.kozlov@mtu-net.ru; тел.: (095) 452-38-01).



Образование литического комплекса $EAC1qrs$ и возможные механизмы его ингибирования. E – эритроцит, IgG – сенсibilизирующие антитела, $Инг$ – PEI или PMA; (а) – образование комплекса и лизис в отсутствие ингибиторов; (б) – ингибирование лизиса в результате связывания ингибитора с антителами; (в) – ингибирование лизиса в результате связывания ингибитора с “активным центром” молекулы $C1q$; (г) – ингибирование лизиса в результате связывания ингибитора с коллагеноподобными участками молекулы $C1q$ и блокирования присоединения молекул $C1r$ и $C1s$.

тионов и полианионов приводит к ингибированию процесса активации комплемента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования механизма ингибирования активации первого компонента комплемента полизаряженными соединениями в качестве поликатиона был выбран полиэтиленимин (M 50 кДа), а в качестве полианиона – полиметакриловая кислота (M 200 кДа).

Антигемолитическую активность этих веществ изучали, внося их в различных концентрациях в гемолитическую систему, состоящую из эритроцитов барана, кроличьей гемолитической сыворотки и комплемента морской свинки. В контро-

ле добавляли вместо ингибиторов такой же объем 0.15 M NaCl. После инкубирования всех образцов в течение 20 мин при $37^{\circ}C$ отделяли интактные и разрушенные эритроциты центрифугированием и определяли величину гемолиза по оптическому поглощению при 412 нм [5]. Подавление гемолиза на 50% наблюдалось при концентрациях – PEI 0.47 и PMA 0.89 мкг/мл. Таким образом, было показано, что выбранные нами поликатионы и полианионы подавляют комплементопосредованный гемолиз. Следует отметить, что полученные данные о концентрациях эффикторов, подавляющих гемолиз в два раза, не могут быть основой для расчета каких-либо констант и сравнения с результатами дальнейших экспериментов по изучению индивидуальных стадий активации первого компонента комплемента, поскольку зависимость гемолиза от общего количества комплемента носит сложный нелинейный характер и, кроме того, эти предварительные эксперименты были проведены на комплементе морской свинки, в то время как последующие опыты проводились с комплементом человека.

Для исследования действия ингибиторов на стадии связывания $C1q$ человека с иммуноглобулинами был выбран разработанный ранее метод, позволяющий определять константы ингибирования взаимодействия $C1q$ с молекулами иммуноглобулина [1]. Опыт был поставлен таким образом, что после связывания $C1q$ (источником которого являлась сыворотка крови человека) на EA в присутствии ингибитора эритроциты отделялись от всех компонентов растворимой фазы центрифугированием. Количество образовавшегося активного комплекса $EAC1q$ определяли по степени гемолиза эритроцитов в составе этого комплекса, происходящего после добавления реагента $R1q$ (сыворотки, лишенной $C1q$ и содержащей в избытке все остальные компоненты комплемента, в том числе $C1r$ и $C1s$). При этом не лизируются EA , а также те комплексы $EAC1q$, у которых блокирован участок связывания $C1r_2s_2$ (на молекуле $C1q$ – в ее коллагеновой части). Величина гемолиза при этом характеризовала количество $C1q$, связавшегося на EA (см. рисунок). В сериях экспериментов количество связавшегося $C1q$ определяли в присутствии различных концентраций ингибиторов и в их отсутствие.

В первой серии экспериментов ингибиторы (в различных концентрациях) вносили в систему в самом начале, и они могли реагировать с EA (иммуноглобулинами, сорбированными на эритроцитах), $C1q$ и их комплексом $EAC1q$.

Во второй серии проводилась предварительная инкубация ингибиторов (в различных концентрациях) с EA , после чего ингибитор удаляли отмыванием EA и далее последовательно добавляли $C1q$ и $R1q$ как и в первой серии опытов. При этом ингибиторы могли связываться с иммуноглобулинами EA .

Ожидаемые эффекты и константы ингибирования (в мкг/мл) в трех сериях экспериментов (концентрации ингибиторов 3–130 мкг/мл)

| Механизм (для А) Ингибитор (для Б) | Серия 1 Инкубация ингибитора с ЕА, С1q и ЕАС1q | Серия 2 Инкубация ингибитора только с ЕА | Серия 3 Инкубация ингибитора только с ЕАС1q |
|---|--|--|---|
| А. Ожидаемый эффект | | | |
| Связывание ингибитора с иммуноглобулинами ЕА | + | + | – |
| Связывание ингибитора с “активным центром” С1q | + | – | – |
| Связывание ингибитора с коллагеновой частью С1q | + | – | + |
| Б. Результаты | | | |
| Полиэтиленимин | 17 ± 6 | 22 ± 3 | – |
| Полиметакриловая кислота | 8.8 ± 0.1 | – | – |

В третьей серии экспериментов ингибиторы (также в различных концентрациях) добавляли к отделенному центрифугированием комплексу ЕАС1q и после его инкубации с ингибитором эритроциты вновь отделяли центрифугированием перед внесением реагента R1q. При этом ингибиторы могли связываться с коллагеновыми участками молекулы С1q, ответственными за присоединение комплекса С1г₂с₂.

Таким образом (см. таблицу), если ингибитор связывается с “активным центром” С1q, блокируя его взаимодействие с иммунным комплексом, то ингибирование должно наблюдаться только в первой серии экспериментов. Если ингибитор связывается с антителами и блокирует их взаимодействие с С1q, то ингибирование должно проявляться и в первой и во второй сериях опытов. Если же ингибитор связывается с коллагеноподобными частями молекулы С1q (на которых связываются ферменты С1г и С1с), блокируя взаимодействие С1q с С1г и С1с, то ингибирование должно наблюдаться в первой и третьей серии экспериментов.

Как следует из данных таблицы, механизмы ингибирования активации комплемента полиэтиленимином и полиметакриловой кислотой различаются. Если первый связывается с иммуноглобулинами иммунных комплексов и блокирует их взаимодействие с С1q, то полиметакриловая кислота ингибирует связывание С1q с иммунными комплексами, взаимодействуя с “активными центрами” молекулы, расположенными на глобулярных частях этого субкомпонента. Взаимодействия ингибиторов с коллагеноподобными частями молекулы С1q, которые участвуют в связывании С1г₂с₂, обнаружено не было.

Проведенные исследования показали, что заряд-зарядные взаимодействия при образовании комплекса С1q с иммуноглобулинами действительно играют важную роль. Полианионы и поликатионы препятствуют такому комплексообразованию. Хотя в образовании комплекса IgG с С1q, как было показано ранее (обзор литературы см. в статье [1]), принимают участие гидрофоб-

ные, а также положительно и отрицательно заряженные аминокислотные остатки С_H2-домена IgG, блокирование связывания осуществляют поликатионы, взаимодействующие с карбоксильными группами IgG. С другой стороны, полианионы также ингибируют связывание С1q с иммунными комплексами, но уже благодаря взаимодействию с положительно заряженной молекулой С1q.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы: полиэтиленимин (Sigma, США), веронал, мединал (Merck, Германия). Полиметакриловая кислота и другие реактивы – отечественного производства высокой степени чистоты: “ос. ч.” или “х. ч.”.

Получение сенсibilизированных эритроцитов (ЕА) и изотонического вероналового буфера, рН 7.4, содержащего ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ (VBS²⁺), описано в работе [7]. Реагент R1q готовили по методу [8].

Определение антигемолитической активности [5]. В пробирки вносили по 0.25 мл суспензии баранных эритроцитов в 0.15 М NaCl с концентрацией 3%, 0.25 мл кроличьей гемолитической сыворотки, 0.25 мл 0.15 М NaCl, 0.25 мл раствора исследуемого полимера (PEI или РМА) и 0.25 мл водного раствора комплемента морской свинки (8.5 мг/мл). В контрольной пробе вместо исследуемого образца вносили 0.25 мл 0.15 М NaCl. Содержимое пробирок перемешивали встряхиванием и инкубировали при 37°C в течение 20 мин, дважды за это время аккуратно встряхивая. После этого пробы охлаждали до 4°C, разбавляли 0.15 М NaCl в 8 раз, центрифугировали при 2500 g 3 мин при 10°C, супернатант отделяли декантированием и в пробах измеряли оптическое поглощение при 412 нм, по которому судили о степени гемолиза и его подавлении под действием полимеров.

Изучение ингибирования активности С1q полимерами проводили как в работе [1], варьируя способ инкубации с ингибиторами.

Серия 1. 100 мкл раствора полимера в конечных концентрациях 3–130 мкг/мл в VBS²⁺ смеси-

вали с 200 мкл суспензии ЕА (1.5×10^8 клеток/мл) в VBS^{2+} при 4°C . Добавляли 0.1 мкл человеческой сыворотки и инкубировали 15 мин при 30°C . Реакцию останавливали, охлаждая пробы до 0°C , центрифугировали 10 мин при 1500 g с охлаждением. Надосадочную жидкость тщательно декантировали, а оставшийся осадок клеток (ЕАС1q) ресуспендировали в 500 мкл реагента R1q в VBS^{2+} и инкубировали 30 мин при 37°C . Добавляли 2.5 мл 0.15 М NaCl, центрифугировали 10 мин при 1500 g и измеряли поглощение надосадочной жидкости (A_{412}). Измеренные величины A_{412} опытных проб (A), контроля для полного лизиса эритроцитов (K_L), получаемого эндосмотическим шоком в дистиллированной воде, и контроля без C1q (K_R) использовали для расчета величины z по формуле:

$$z = \ln[(K_L - K_R)/(K_L - A)],$$

где величина z линейно связана с числом молекул C1q, связавшихся с ЕА [1].

Константу ингибирования K_i рассчитывали по линейному уравнению:

$$1/z_i = [I]/z_0 \cdot 1/K_i + 1/z_0,$$

где [I] – концентрация эффектора, z_i – величина z для i -й концентрации эффектора, z_0 – величина z при [I] = 0. При этом точка пересечения графика зависимости $1/z_i$ от [I] с осью абсцисс соответствует значению $-K_i$ [1].

Серия 2. 100 мкл раствора полимера в конечных концентрациях 3–130 мкг/мл в VBS^{2+} инкубировали с 200 мкл суспензии ЕА (1.5×10^8 клеток/мл) в VBS^{2+} 15 мин при 15°C , после чего ЕА отделяли центрифугированием, осадок ЕА ресуспендировали в VBS^{2+} и далее последовательно до-

бавляли C1q (0.1 мкл сыворотки человека) и R1q как и в первой серии опытов.

Серия 3. 200 мкл ЕА и 0.1 мкл сыворотки инкубировали 15 мин при 30°C , центрифугировали, осадок ресуспендировали в 190 мкл VBS^{2+} и добавляли 100 мкл раствора ингибитора в VBS^{2+} в тех же конечных концентрациях. После инкубации в течение 15 мин при 30°C вновь центрифугировали, ресуспендировали осадок, добавляли реагент R1q и инкубировали 30 мин при 37°C . Эксперимент завершали как и в серии 1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 99-04-48793) и МАС (грант № 01-04-06330).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Л.В., Сизой М.Н., Зинченко А.А., Левковский А.В. // Биохимия. 1986. Т. 51. С. 707–718.
2. Emanuel E.J., Brampton A.D., Burton D.R., Dwek R.A. // Biochem. J. 1982. V. 205. P. 361–372.
3. Loos M., Trinder P.K.E., Kaul M. // The Complement System / Eds K. Rother, G.O. Till, G.M. Hansch. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1998.
4. Козлов Л.В., Белкин З.П., Бичучер А.М., Баталова Т.Н., Дьяков В.Л. // Вопросы мед. химии. 2002. Т. 48 (в печати).
5. Каплун А.П., Бурделев О.О., Иванова Н.Н., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 68–77.
6. Villiers C.L., Arlaud G.J., Colomb M.G. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 140. P. 421–426.
7. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П., Молчанова Н.Н. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 652–659.
8. Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Баталова Т.Н., Гузова В.А. Патент № 2128509 // Б.И. 1999. № 10.

The Mechanism of Inhibitory Effect of Polyaniions and Polycations on the Activation of the Complement First Component

O. O. Burdelev*, A. P. Kaplun*, L. V. Kozlov***,
S. V. Lysakova**, V. L. D'yakov**, and V. I. Shvets*

*Phone: +7 (095) 452-3801; e-mail: l.v.kozlov@mtu-net.ru

* Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

** State Enterprise Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Admirala Makarova 10, Moscow, 125212 Russia

Polyethyleneimine (PEI, 50 kDa) and polymethacrylic acid (PMA, 200 kDa) were shown to inhibit the lysis of sheep erythrocytes induced by the guinea pig complement. They twofold suppress the hemolysis at the concentrations of 0.47 and 0.89 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The inhibitory effect on the binding of the C1q subunit of human complement to the sensitized sheep erythrocytes (EA) was found to depend on the component of the reaction with which the inhibitors were preliminarily incubated. When an inhibitor, C1q, and EA were simultaneously incubated, the inhibition constants for PEI and PMA were 17 ± 6 and $8.1 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$, respectively. The preincubation of EA with PEI and the subsequent washing out of the inhibitor resulted in the inhibition constant of $22 \pm 3 \mu\text{g/ml}$. No inhibitory effect was observed after a similar preincubation of EA with PMA. No inhibition was also detected when the inhibitors were added after the formation of the C1q complex with antibodies. These observations suggest that the binding of antibodies to cationic PEI prevents the C1q-antibody complex formation, while the binding of anionic PMA to the active site of C1q impedes the interaction of this subunit with immunoglobulins. Moreover, within the range of concentrations studied, the studied inhibitors did not affect the subsequent C1q binding to the C1r and C1s enzymes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: complement system, C1q subunit, mechanism of inhibition; polyethyleneimine; polymethacrylic acid