

УДК 577.15.08

©Коллектив авторов

ВРОЖДЕННЫЕ ДЕФИЦИТЫ ИЗОТИПОВ С4А И С4В КОМПОНЕНТА С4 КОМПЛЕМЕНТА У ЛИЦ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ХЛАМИДИЯМИ

Л.В.КОЗЛОВ, Т.А.СКИРДА, Т.Г.СКОРОХОДОВА, В.М.ЛАХТИН,
Т.Н.БАТАЛОВА, В.А.ГУЗОВА

НИИ Эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского,
125212 Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, факс 452-18-30,
Эл. почта: l.v.kozlov@mtu-net.ru

Для обнаружения врожденного дефицита изотипов А и В компонента С4 комплемента человека использовано соотношение функциональных активностей этих изотипов, определяемых иммуноферментным методом. Частота встречаемости дефицитов у здоровых лиц (доноров крови) одинакова для С4А и С4В и составила величину 0,14 (по каждому изотипу), т.е. 14% общего числа (22) доноров, или 28% суммарно. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными, по которым частота дефицитов С4А составляет 0,14, а С4В – 0,11-0,16.

Исследованы врожденные дефициты С4А и С4В у лиц, инфицированных хламидиями. Для этого обследованы пациенты (35 человек), имевшие в крови антитела (IgG или IgM) к роду *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. psittaci* и *C. pneumoniae*). Частота дефицитов С4А составила 0,29, а частота дефицитов С4В – 0,46. Таким образом, число бездефицитных пациентов составило лишь 25%, в то время как среди здоровых лиц обычно наблюдается 70-75% индивидуумов, не имеющих дефицитов изотипов С4 компонента комплемента. Наличие дефицитов изотипов С4 при этой патологии выявлено впервые. Полученные данные свидетельствуют о предрасположенности лиц, имеющих врожденные дефициты компонента С4 комплемента к развитию заболеваний, обусловленных хламидиозом.

Ключевые слова: система комплемента, изотипы С4А и С4В, дефициты, хламидиоз, иммуноферментный метод.

ВВЕДЕНИЕ. Компонент С4 системы комплемента по его количеству в крови и по функциональной важности занимает, наряду с компонентом С3, ключевые позиции в эффекторном действии комплемента [1]. С4 принадлежит к антигенам класса III главного комплекса гистосовместимости. Существенной особенностью компонента С4 является наличие двух изотипов С4А и С4В – продуктов двух генов, характеризующихся высоким полиморфизмом [2]. С4А

соответствует антигену Rodgers группы крови, а C4В – Chido [3]. Частота (в норме до 15%) встречаемости нулевых молчащих аллелей *C4AQ0* и *C4BQ0* относительно высока [2]. В случае гетерозиготности около 30% индивидуумов имеет пониженное содержание одного из изоформ компонента C4, так как синтез его в этих случаях осуществляется только одним из двух генов, полученных от родителей, при гомозиготности (оба его гена нулевые) отмечается полное отсутствие данного изоформы. Различия в химическом строении изоформ – присутствие в непосредственной близости от тиолсложноэфирной связи остатка гистидина в молекуле C4В и отсутствие такого каталитического остатка в молекуле C4А – приводит к различиям в химической активности и специфичности этих изоформ. После активации C4А ацилирует белки (аминные нуклеофилы) с более высокой скоростью, чем C4В, в то время как C4В быстрее взаимодействует с углеводами (гидроксильные нуклеофилы) по сравнению с C4А [1]. Такие отличия в активности и специфичности изоформ C4 обуславливают неодинаковый ответ комплемента на активацию иммунными комплексами в зависимости от того, какие нуклеофилы (аминные или гидроксильные) преобладают в антигене, участвующем в образовании иммунного комплекса. Кроме того, опсонизированные иммунные комплексы, образованные белковым антигеном, несут на своей поверхности преимущественно C4Ab-фрагменты, а образованные углеводным антигеном – C4Bb-фрагменты. Судьба опсонизированных иммунных комплексов может несколько различаться, поскольку рецептор комплемента CR1, играющий важную роль в клиренсе иммунных комплексов, значительно лучше связывает активированный C4Ab, чем C4Bb [4]. Все эти обстоятельства могут, по-видимому, объяснять повышенную частоту встречаемости нулевых аллелей при различных заболеваниях, связанных с формированием и удалением иммунных комплексов, т.е. предрасположенность лиц, обладающих дефицитами C4А или C4В, к определенным заболеваниям, о чем имеются сведения в литературе [5]. Так, нулевые аллели C4 часто встречаются при таких тяжелых заболеваниях, как системная красная волчанка [6], диабет [7], хронический гепатит [8]. Носители нулевых аллелей C4 имеют повышенный риск не пережить критический возрастной период (53-62 года) [9]. Следует отметить, что далеко не все болезни были исследованы на частоту встречаемости дефицитов изоформ C4. Это объясняется тем, что изотипирование по C4 не стало еще достоянием широкой клинической практики из-за сложности методов таких анализов и их высокой стоимости. В мире в настоящее время имеется около 15 референс-лабораторий, проводящих такие исследования [2]. Разработанный нами недавно метод определения функциональной активности компонента C4 комплемента человека с дифференциальным определением активностей C4А и C4В изоформ позволяет быстро и сравнительно просто выявлять наличие дефицитов этих изоформ [10]. Поскольку снижение функциональной активности C4 может наблюдаться в результате потребления комплемента в воспалительном процессе при заболевании или вследствие сниженной его продукции, то в качестве критерия наследственного дефицита какой-либо из изоформ C4 мы предложили оценивать соотношение активностей C4А и C4В, каждая из которых определялась своим специфическим методом. Потребление комплемента в результате его активации приводит к снижению обеих активностей C4А и C4В, поэтому врожденный дефицит может быть

обнаружен на уровне и высокого, и низкого общего содержания белка С4 и проявляется только в соотношении этих активностей.

До настоящего времени, опубликовано мало работ, посвященных изучению предрасположенности к инфекционной патологии лиц с дефицитами изоформ С4 компонента комплемента. Так, повышенная встречаемость полного дефицита С4В была обнаружена у детей, инфицированных *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* или *Neisseria meningitidis* [11]. Можно полагать, что не только полные, но и частичные дефициты изоформ С4 могут быть причиной пониженной резистентности к инфекционному поражению, невосприимчивостью к вакцинации и бактерионосительству. Этот вопрос до настоящего времени недостаточно исследован.

Работа посвящена исследованию частоты встречаемости дефицитов изоформ С4 компонента комплемента у пациентов, у которых были выявлены IgG и IgM антитела к роду *Chlamydia*.

МЕТОДИКА. Обследованию на содержание врожденных дефицитов изоформ С4 были подвергнуты сыворотки крови 35 пациентов (19 мужчин, 16 женщин, среди них 12 детей в возрасте от 1 года до 12 лет, остальные взрослые), инфицированных хламидиозом, а также (для сравнения) сыворотки 22 здоровых доноров крови.

Антитела IgG и IgM к роду *Chlamydia* определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест». Сочетания тест-систем позволило оценивать антитела суммарно к *C. trachomatis*, *C. psittaci* и *C. pneumoniae*. Серопозитивными считались образцы с титрами антител выше 1:100 для IgM и 1:40 для IgG.

В работе использовали компьютерные программы для методов иммуноферментного анализа и радиальной иммунодиффузии, реализуемые ООО "Микрофлора" при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 96-луночные плоскодонные микропанели отечественного производства (ГОСНИИМЕДПОЛИМЕР, г. Москва), твин 20 (Sigma, США), пероксидазу хрена НПО "Биохимреактив" (г. Олайне, Латвия), остальные реактивы – отечественного производства качества не ниже ч.д.а.

Конъюгаты кроличьих IgG-антител к С4 человека с пероксидазой получали традиционными методами [12]. IgG3 выделяли из сыворотки крови больного множественной миеломой путем хроматографии на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman, Великобритания). Липополисахариды *S. sonnei*, полученные водно-фенольной экстракцией по Вестфалу [13], любезно предоставлены З.П. Белкиным (МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского).

Получение кроличьих антител к компоненту С4 комплемента человека. 1 мг высокоочищенного компонента С4 [14] комплемента человека в 1 мл изотонического фосфатного буфера, рН 7,4, тщательно перемешивали с 1 мл полного адьюванта Фрейнда (Difco Lab., США) и вводили внутримышечно кроликам в 10 точек спины. Иммунизацию повторяли с полным адьювантом Фрейнда 2-3-раза через 10 суток. Через 10 суток после последней иммунизации забирали кровь из ушной вены. Иммуническую сыворотку контролировали на наличие антител к сывороточным белкам человека стандартным методом иммуноэлектрофореза [15]. В том случае, если иммунная сыворотка выявляла в нормальной сыворотке человека только одну полосу компонента С4 в зоне β1-глобулинов и не содержала антител к другим белкам сыворотки человека, такую

антисыворотку считали моноспецифичной и использовали для выделения фракции IgG хроматографией на DEAE-целлюлозе. Если же иммунная сыворотка в иммуноэлектрофорезе давала дополнительную линию преципитации (как правило, с компонентом С3), такую иммунную сыворотку истощали по анти-С3 антителам добавлением препарата компонента С3 [16].

Фракцию IgG антител выделяли из иммунной сыворотки хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman, Великобритания).

Определение функциональной активности С4А (метод А) [10]. Иммунохимически чистый IgG3 или суммарный IgG или IgM или их агрегаты, полученные предварительным нагреванием при 63°C, растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, рН 9,5, в концентрациях 10-100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета. Закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Два раза отмывали планшет вероналовым буферным раствором, рН 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 ("вытряхивая" остатки жидкости). В 8 лунок каждого вертикального ряда планшета вносили по 100 мкл раствора, содержащего С4 в растворе VBS²⁺, в виде прогрессивных двукратных разведений. Во все лунки планшета вносили по 10 мкл сыворотки морской свинки. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмывки фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин 20, и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против компонента С4 человека в том же буфере в подобранном разведении. 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. 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 С4 рассчитывали с помощью компьютерной программы, в качестве стандарта использовали пул из 10 сывороток доноров.

Определение функциональной активности С4В (метод В) [10]. Препарат липополисахарида *S. sonnei* растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, рН 9,5, в концентрациях 10-100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета. Закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Далее все операции проделывали аналогично методу А.

Определение изотипов С4 компонента комплемента [10]. После определения функциональной активности С4А и С4В методами А и В делили полученное значение активности С4В на значение для С4А (В/А) и вычисляли процент от стандартного соотношения, определенного для пула сывороток 10 доноров крови. Значения отношения активностей С4В к С4А в 2 и более раз выше или в 2 и более раз ниже стандарта, полученного для пула из 10 сывороток здоровых доноров, означали наличие соответственно дефицитов С4А или С4В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для определения врожденных дефицитов изотипов С4А и С4В компонента С4 комплемента человека предложен метод, в основе которого лежит сравнение отдельно определяемых функциональных активностей С4А и С4В. Теоретически можно ожидать, что при гетерозиготном дефиците одного из изотипов и его активность падает в два раза и

соотношение активностей становится равным или 0,5 или 2, по сравнению с 1 в бездефицитном случае. Это определяется наличием 4 функционирующих генов (C4A и C4B от отца и они же от матери), поэтому дефицит лишь по одному из генов снижает вдвое активность данного изотипа. Более редкий гомозиготный дефицит приводит к еще большей разбалансировке активностей, поэтому соотношение активностей становится или меньше 0,5 или выше 2. Строго говоря, внутри каждого изотипа могут происходить небольшие колебания активностей из-за аллотипических различий, но, как показывает опыт, эти колебания, по-видимому, несущественны для наших определений. Наконец, весьма редко встречающийся дефицит по обоим изотипам одновременно не приводит к изменению нормального соотношения активностей, однако и он может быть дифференцирован по низкой активности обоих изотипов.

Возможность определения врожденных дефицитов изотипов C4 компонента комплемента человека была проверена на сыворотках крови здоровых доноров крови (таблица 1). Как следует из данных таблицы, частота дефицитов для C4A и C4B одинакова и составляет 14% общего числа доноров. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными, согласно которым частота дефицитов C4A составляет 0,14, а C4B – 0,11-0,16 [17-19].

Таблица 1 Определение наличия дефицитов C4A и C4B в сыворотке крови доноров

№	Относительная активность		Отношение активностей C4B/C4A	Дефицит изотипа
	C4A	C4B		
1	1,24	1	0,81	
2	0,89	0,6	0,67	
3	0,77	0,76	0,99	
4	0,23	0,66	2,87	A
5	0,62	1,4	2,25	A
6	2,78	1,35	0,49	B
7	1,16	0,98	0,84	
8	0,66	0,59	0,89	
9	0,97	0,73	0,75	
10	1,55	0,91	0,59	
11	0,78	1,41	1,81	A
12	0,84	0,86	1,02	
13	0,89	0,91	1,02	
14	0,93	0,54	0,58	
15	0,98	0,66	0,67	
16	0,82	1,08	1,32	
17	0,88	1,23	1,4	
18	0,98	0,56	0,57	
19	0,84	0,78	0,93	
20	0,75	0,31	0,41	B
21	0,83	0,68	0,82	
22	0,67	0,02	0,03	B
Частота дефицитов C4A 0,14				
Частота дефицитов C4B 0,14				

Было проведено определение врожденных дефицитов С4А и С4В в сыворотках крови больных, содержащих высокие титры антител IgG и IgM к роду *Chlamydia* (таблица 2).

Таблица 2. Определение наличия дефицитов С4А и С4В в сыворотке крови больных, с высокими титрами антител к роду *Chlamydia*

Больной	Титр IgM	Титр IgG	Относительная активность		Отношение активностей С4В/С4А	Дефицит изотипа
			С4А	С4В		
Пал.	-	320	0,25	0,23	0,92	
Вас.	-	80	1,63	1,41	0,86	
Дж.	400	20	1,10	1,46	1,32	
Чер.	200	40	1,07	0,50	0,47	В
Юм.	-	640	1,15	0,50	0,43	В
Дз.	-	320	1,64	0,59	0,36	В
Ив.	200	20	1,24	0,52	0,42	В
Шул.	200	-	0,82	0,30	0,37	В
Восв.	-	40	0,92	6,30	6,85	А
Гус.	200	640	2,02	2,93	1,45	А
Кир.	-	40	1,00	1,15	1,16	
Мус.	-	160	0,61	0,97	1,58	А
М.	-	640	0,03	0,26	8,11	А
Щ.	-	640	1,22	0,81	0,67	
Д.	-	40	3,34	0,21	0,06	В
Ис.	-	40	3,48	1,19	0,34	В
Кис.	100	80	2,31	1,19	0,51	
Лан.	-	160	2,43	0,40	0,16	В
Поз.	-	640	0,03	0,22	7,97	А
Куз.	-	80	1,39	0,19	0,14	В
И.	-	160	2,12	0,20	0,09	В
Г.	-	20	2,46	0,32	0,13	В
Р.	-	640	2,04	0,48	0,24	В
Щук.	-	40	2,00	4,41	2,20	А
Геор.	-	320	0,13	0,80	6,28	А
Х.	-	40	0,53	0,39	0,74	
Киз.	-	320	2,38	0,33	0,14	В
Ув.	-	160	1,15	0,02	0,02	В
Гол.	-	640	0,31	0,50	1,64	А
Мал.	-	160	1,45	1,81	1,25	
Бат.	-	320	1,00	1,32	1,31	
Фил.	-	80	0,88	0,22	0,25	В
Сол.	-	1280	0,41	0,63	1,53	А
Рам.	-	640	0,86	1,45	1,69	А
Сил.	-	640	1,28	0,44	0,34	В
Частота дефицитов С4А 0,29						
Частота дефицитов С4В 0,46						

Как следует из данных таблицы частота дефицитов С4А в два раза, а С4В в три раза превышает частоту соответствующих дефицитов у здоровых людей.

Ранее изотипирование по С4 больных хламидийными инфекциями не проводилось. Однако, инфицирование хламидиями было найдено у многих больных, имеющих ревматоидный фактор и страдающих аутоиммунными заболеваниями [20]. Кроме того, между наличием антител к хламидиям и антинуклеарного фактора и антител к ДНК наблюдался параллелизм [20]. При этом следует помнить, что пациенты с системной красной волчанкой и ревматоидным артритом имеют повышенную встречаемость нулевых аллелей С4 [6,21].

Обнаруженная нами столь высокая частота встречаемости дефицитов изотипов С4 у пациентов, инфицированных хламидиями, не может быть случайной и, вероятно, она и обуславливает предрасположенность к хламидиозам. Следует отметить, что наибольший вклад вносит, по-видимому, дефицит изотипа С4В. Как уже отмечалось, изотипы отличаются по своей способности опсонизировать белковый и полисахаридный антигены – если С4А после активации ковалентно связывается преимущественно с белками, то С4В – с углеводами. В связи с этим интересно обратить внимание, что антигенными свойствами хламидий обладают белок и липополисахарид (ЛПС) наружной мембраны. Предполагается, что ЛПС хламидий обладает способностью модулировать экспонирование антигенных детерминант белка наружной мембраны [22]. Вероятно этим объясняется снижение резистентности организма к хламидийной инфекции при наличии дефицитов изотипов С4 и именно в наблюдаемом соотношении дефицитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Low S.K.A., Dodds A.W. (1997) *Protein Science*, **6**, 265-274.
2. Mauff G., Alper C.A., Awdeh Z., Batchelor R., Bertrams J., Bruun-Petersen G., Dawkins R.L., Démant P., Edwards J., Grosse-Wilde H., Hauptmann G., Klouda P., Lamm L., Mollenhauer E., Nerl C., Olaisen B., O'Neill G., Rittner C., Roos M.H., Skanes V., Teisberg P., Wells L. (1983) *Immunobiology*, **164**, 184-191.
3. O'Neill G.J., Yang S.Y., Tegoli J., Berger R., Dupont B. (1978) *Nature*, **273**, 668-670.
4. Reilly B.D., Mold C. (1997) *Clin. Exp. Immunol.*, **110**, 310-316.
5. Brai M., Accardo P., Bellavia D. (1994) *Ann. Ital. Med. Int.*, **9**, 167-172.
6. Fielder A.H., Walport M.J., Batchelor J.R., Rynes R.I., Black C.M., Dodi I.A., Hughes G.R. (1983) *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, **286**, 425-428.
7. Bertrams J., Hintzen U., Schlicht V., Schoeps S., Gries F.A., Louton T.K., Baur M.P. (1984) *Immunobiology*, **166**, 335-344.
8. Vergani D., Wells L., Lacher V.F., Nasaruddin B.A., Davies E.T., Mieli-Vergani G., Mowat A.P. (1985) *Lancet*, **2**, 294-298.
9. Kramer J., Rajczy K., Füst G. (1989) *Immunology Letters*. **20**, 83-86.
10. Козлов Л.В., Лахтин В.М., Скороходова Т.Г., Баталова Т.Н., Шойбонов Б.Б., Дьяков В.Л., Гузова В.А., Матвеевская Н.С. (2000) *Биоорг. химия.*, **26**, 539-547.
11. Bishof N.A., Welch T.R., Beischel L.S. (1990) *J. Infect. Dis.*, **162**, 248-250.
12. Getty D., Raykundalia C., Houba V. (1983) *WHO IMM/PIR.*, № 83.1.

13. Westphal O., Jann K. (1965) *Methods in Carbohydrate Chemistry*. (Wistler ed), London. **5**, 83-91.
14. Козлов Л.В., Шибанова Е.Д., Зинченко А.А. (1987) *Биохимия*, **52**, 660-666.
15. Ouchterlony O., Nilsson L.-A. (1978) *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwells, Oxford. **1**, 19.1-19.44.
16. Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Мишин А.А., Гузова В.А., Баталова Т.Н., Лысакова С.В. (2000) Способ получения компонента С3 комплемента человека. Патент № 2144365 (Россия). Бюл. № 2.
17. Awdeh Z.L., Alper C.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2576-3580.
18. Kramer J., Rajczy K., Fust G. (1989) *Immunol. Lett.* **20**, N 1. P.83-85.
19. Schendel D.J., O'Neill G.J., Wank R. (1984) *Immunogenetics*, **20**, N 1, 23-31.
20. Ghinsberg R.C., Zigner D., Shoshani-Perlmutter R., Elyan M., Nitzan Y. (1989) *Microbiologica*. **12**, 291-296.
21. Clarkson R.W., Sanders P.A., Grennan D.M. (1992) *Br. J. Rheumatol.* **31**, N 1, 53-54.
22. Vretou E., Psarrou E., Spiliopoulou D.J. (1992) *Gen. Microbiol.* **138**, 1221-1227.

Поступила 16.11.2000.

INHERENT DEFICIENCY OF C4A AND C4B ISOTYPES OF THE C4 COMPONENT OF COMPLEMENT AT PERSONS INFECTED BY CHLAMYDIA

L.V. KOZLOV*, T.A. SKIRDA, T.G. SKOROKHODOVA, V.M. LAKHTIN,
T.N. BATALOVA, V.A. GUZOVA

Gabrichevskii Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
ul. Admirala Makarova, 10, Moscow, 125212, Russia. Fax +7095-452-18-30.
e-mail: l.v.kozlov@mtu-net.ru.

The difference in the functional activity of the isotypes A and B of component C4 of human complement was used to determine their ratio to detect the inherited deficiency of the isotypes. The frequency of deficiency in healthy persons blood donors was equal for C4A and C4B (0.14 for each isotype), i.e. 14 % of total number (22) donors, or 28 % totally. These results agree with the literary data, on which the frequency of deficiency of C4A is 0,14, and of C4B is 0.11-0.16.

The inherent deficiencies of C4A and C4B for persons infected by *Chlamydia* were studied. For this purpose the patients (35 persons) with in blood antibodies (IgG or IgM) to *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. psittaci* and *C. pneumoniae*) were investigated. The frequencies of deficiency of C4A and C4B were 0.29 and 0.46 respectively. Thus, the number of the undeficiencyt patients was only 25 %, while among healthy persons 70-75 % of individuals not having deficiencies of isotypes C4 were observed. The deficiencies of isotypes of C4 at this pathology is detected for the first time. The obtained data suggest the existenc of the predisposition to the development of diseases stipulated by *Chlamydia* in persons with inherent deficiency of C4 component of complement.

Key words: complement system, isotypes C4A and C4B, deficits, *Chlamydia*, ELISA.