

УДК 612.124

©Коллектив авторов

СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА В ОПЫТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*: ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ИНГИБИРОВАНИЯ СУБКОМПОНЕНТА C1q И ИНГИБИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕМЕНТА НА МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Л.В. Козлов, З.П. Белкин, А.М. Бичучер, Т.Н. Баталова, В.Л. Дьяков

ГУМосковский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Минздрава РФ,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел.: (095)452-38-01;
эл. почта: L.V.Kozlov@mtu-net.ru

Для исследования воздействия лекарственных веществ на систему комплемента разработаны методы изучения ингибирования системы комплемента *in vitro* и *in vivo*. Первый из них - иммуноферментный метод определения ингибирования первой стадии каскада активации классического пути комплемента: связывания субкомпонента C1q с иммуноглобулином. Вторым - подавление описанного ранее летального действия комплемента норки при внутривенном введении сыворотки норки мышам. В качестве лекарственных веществ-ингибиторов комплемента изучено действие известных своим ингибирующим действием гепарина (антикоагулянт) и сурамина (препарат для лечения трипаносомии). Первым методом было найдено, что константа ингибирования связывания C1q сурамином равна 411 ± 29 мкг/мл (или $0,287 \pm 0,020$ мМ), а соответствующая константа для гепарина равна $36,4 \pm 1,7$ мкг/мл ($2,28 \pm 0,10$ мкМ), т.е. связывание гепарина с C1q в 10 раз лучше, чем сурамина, в весовом отношении или в 100 раз лучше - в молярном. Второй метод основан на способности сыворотки норки убивать мышей при внутривенном введении, благодаря действию системы комплемента. Введение 3 мг сурамина или 0,3 мг гепарина на мышь предотвращает гибель мышей, вызываемую внутривенным введением 0,08 мл сыворотки норки, т.е. эффективность действия этих ингибиторов комплемента в опытах *in vivo* также отличается в 10 раз, а их концентрации в крови животных, примерно, соответствуют константам ингибирования связывания C1q, полученным методом *in vitro*.

Ключевые слова: комплемент, компонент C1q, ингибирование, сурамин, гепарин, ИФА, сыворотка крови норки, мышь, токсичность

ВВЕДЕНИЕ. Изучение воздействия лекарственных веществ на систему комплемента является важной задачей. Из-за отсутствия хороших и доступных методов определения способности веществ действовать на систему комплемента *in vitro* и *in vivo* исследования побочного действия лекарств, а также широкий поиск новых фармацевтических средств, способных регулировать функциональную активность комплемента практически не проводятся. Данные литературы указывают на осложненное течение заболеваний вследствие побочного действия лекарственных веществ на комплемент, в одних случаях, а также на позитивный результат направленного воздействия на систему комплемента в других [1,2]. В связи с этим разработка методов определения действия на систему комплемента эндогенных и экзогенных факторов является

ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА *IN VITRO* И *IN VIVO*

актуальной задачей. Ранее нами были разработаны гемолитические методы для определения ингибирующего действия различных веществ на связывание C1q [3], ингибирование образования C5-конвертазы [4,5], а также иммуноферментные методы для определения ингибирования образования C3-конвертазы [6] и C5-конвертазы [7].

Для блокирования всего классического пути активации комплемента наиболее эффективным приемом является ингибирование связывания C1q с иммунными комплексами. В связи с этим был разработан иммуноферментный метод определения ингибирования первой стадии каскада активации классического пути комплемента: связывание субкомпонента C1q с иммуноглобулином. Иммуноферментный метод позволяет выделить исключительно стадию связывания C1q с иммуноглобулином и полностью исключить возможное воздействие изучаемого ингибитора на последующие стадии каскада, что не всегда удается при использовании гемолитического метода, когда о результатах действия вещества на первой стадии каскада судят по конечной стадии - лизису эритроцита.

Для того чтобы видеть результаты действия веществ на комплемент на уровне организма, полезно иметь экспериментальную модель на животных, особенно необходимую при создании новых лекарственных веществ, способных действовать на систему комплемента.

В литературе описан один такой метод, когда морской свинке [8] внутривенно вводят кроличью иммунную сыворотку, содержащую антитела к эритроцитам морской свинки. При этом в результате активации комплемента у животных происходит кровоизлияние в легкие. Для изучения способности веществ отменять действие комплемента за две минуты до введения иммунной сыворотки животным также внутривенно вводят тестируемое вещество. По снижению степени кровоизлияния в легкие судят об эффективности ингибирующего действия вещества на комплемент *in vivo*. Нами был разработан способ, позволяющий определять ингибирующее действие веществ на комплемент на модельных животных, с использованием в качестве модельных животных беспородных мышей, а в качестве источника комплемента и антител к клеткам крови животного - сыворотку норки, комплемент которой обладает высокой активностью и в которой присутствуют в высоких титрах естественные антитела к эритроцитам мышей [9,10].

МЕТОДИКА. В работе использовали сурамин фирмы "Bayer" (Германия), гепарин фирмы "Srofa" (Чехия), лизоцим ("Феррейн"), 96-луночные плоскодонные планшеты (ГОСНИИМЕДПОЛИМЕР, Москва), твин-20 ("Sigma", США), пероксидазу хрена фирмы "Merck" (Германия), DEAE-сефацель "Pharmacia" (Швеция). Иммунохимически чистый IgG3 выделяли из сыворотки крови больного множественной миеломой. Остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а. были отечественного производства. Конъюгаты кроличьих IgG-антител к субкомпоненту C1q с пероксидазой получали традиционными методами [11]. Кровь получали от 10 норок обоего пола массой 1-1,5 кг стандартной коричневой породы из зверосовхоза "Салтыковский". Кровь брали из сердца после забоя животных внутримышечной инъекцией дитилина.

Сыворотки норки и доноров крови, полученные со станции переливания крови, до исследования хранили при -20°C.

Субкомпонент C1q получали, как описано ранее [12].

Для получения кроличьих антител к субкомпоненту C1q комплемента человека раствор 500 мкг высокоочищенного субкомпонента C1q в 0,5 мл изотонического фосфатного буфера, pH 7,4, смешивали с 1,5 мл полного адьюванта Фрейнда ("Difco Lab", США) и вводили внутрикожно в 10 точек спины. Кровь забирали через 1,5-2 месяца из ушной вены. Иммунную сыворотку контролировали на наличие антител к сывороточным белкам человека стандартным методом иммуноэлектрофореза [13].

Определение константы ингибирования связывания субкомпонента C1q комплемента человека. Иммунохимически чистый IgG3 растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрации белка 30 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонной полистироловой 96-луночной микропанели. Планшеты закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4° С. После чего три раза отмывали фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, затем осушали путем встряхивания остатка жидкости. В другом планшете готовили серии двукратных разведений свежей сыворотки крови человека (в качестве источника C1q) в фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, общий объем в лунке 50 мкл. Затем во все лунки каждой серии вносили по 50 мкл раствора исследуемого ингибитора при постоянной для каждой из 5 серий концентрации, а в контроле 50 мкл буфера без ингибитора, содержимое лунок этого планшета переносили в первый планшет. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С, двукратной отмывки фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против субкомпонента C1q человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С и двукратной отмывки с детергентом и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного буфера (10 мг орто-фенилендиамина в 25 мл цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 30 мин инкубации в темноте реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом, измеряя светопоглощение при 492 нм. Функциональную активность C1q без ингибитора - a_0 и a - для каждой концентрации ингибитора [I] рассчитывали по стандартной кривой. Константу ингибирования K_i определяли по линейному уравнению $1/a = [I]/(a_0 K_i) + 1/a_0$, аналогичному соответствующему уравнению для гемолитического метода [3], строя график зависимости $1/a$ от [I]. При этом точка пересечения графика с осью абсцисс соответствует значению K_i .

Определение ингибирующего действия веществ на комплемент на модельных животных. В опытах использовали белых беспородных мышей весом 16-18 г. В контрольных группах животным вводили в ретроорбитальное венозное сплетение 0,06-0,08 мл сыворотки крови норки, доведенной до объема 1 мл раствором 0,15 М NaCl. В опытных группах животных в этом растворе дополнительно содержалось 10 мг ингибитора. В одном из опытов 10 мг ингибитора в объеме 0,5 мл вводили за 2 мин до введения сыворотки норки также в общем объеме 0,5 мл. Число погибших животных подсчитывали через сутки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В основу иммуноферментного метода определения ингибирования связывания субкомпонента C1q с антителами был положен метод ИФА определения функциональной активности C1q [14].

Поскольку известно, что Ig лучше всех иммуноглобулинов G связывается с C1q [15], в работе был использован миеломный моноклональный IgG3. В присутствии ингибитора исследовалось уменьшение количества C1q, связавшегося с иммуноглобулином G3, сорбированном в лунках микропанели.

При сорбции иммуноглобулина на поверхности полимерного планшета происходит естественная его агрегация, необходимая для хорошего связывания C1q [16]. Количество связавшегося C1q с иммуноглобулином G3 на панели определяли с помощью конъюгата с пероксидазой хрена кроличьих антител к C1q. Таким образом, константа ингибирования связывания C1q с молекулами иммуноглобулина численно равняется той концентрации ингибитора, при которой половина функциональных центров молекулы C1q блокирована ингибитором. Это соответствует блокированию в среднем 3-х из 6-ти глобулярных функциональных доменов молекулы C1q.

Мы провели сравнение иммуноферментного метода с разработанным ранее гемолитическим [3,17]. В гемолитическом методе исследуется ингибирование

ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА *IN VITRO* И *IN VIVO*

связывания C1q с иммуноглобулинами, образующими иммунный комплекс с эритроцитами. Количество связавшегося C1q с иммуноглобулинами на эритроцитах определяется по способности этих эритроцитов к лизису после добавления остальных компонентов комплемента, осуществляющих весь каскад активации системы, завершающийся сборкой на поверхности эритроцита мембраноатакующего комплекса, приводящего к лизису эритроцита. Таким образом, константа ингибирования продуктивного связывания C1q с молекулами иммуноглобулина численно равняется той концентрации ингибитора, при которой половина молекул C1q не способна так связываться с иммуноглобулинами на поверхности эритроцита, чтобы приводить к лизису последнего. А это может означать, что даже блокирование одного из 6-ти функциональных доменов может нарушить функционально необходимое связывание C1q на иммуноглобулинах поверхности эритроцита (а не связывание вообще). Известно, что не всякое связывание C1q приводит к активации зимогенов C1r и C1s в составе компонента C1 [18].

Исходя из этих предпосылок, можно предполагать, что константы полученные двумя методами могут численно различаться, при чем величина, полученная методом ИФА, может почти на порядок (до ~6 раз) превышать величину, полученную гемолитическим методом.

Ранее гемолитическим методом нами были найдены константы ингибирования связывания C1q сурамином [17] - $(3,7 \pm 1,3) \cdot 10^{-5}$ М и лизоцимом [3] - $(2,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$ М.

Определение констант ингибирования, проведенное методом ИФА дало величины соответственно $(28,7 \pm 2,0) \cdot 10^{-5}$ М и $(4,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$ М. Полученные данные показывают адекватность обоих методов определения ингибирования связывания C1q, а также подтверждают предполагаемые различия в определениях (табл. 1).

Таблица 1. Ингибирование связывания C1q определенное методом ИФА

Ингибитор	K_i		Литературные данные
	мкг/мл	М	
Лизоцим	6710 ± 1760	$(4,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$ М [3]
Сурамин	411 ± 29	$(2,87 \pm 0,20) \cdot 10^{-4}$	$(3,7 \pm 1,3) \cdot 10^{-5}$ М [17]
Гепарин	$36,4 \pm 1,7$	$(2,28 \pm 0,10) \cdot 10^{-6}$	

По данным литературы [19,20], сурамин способен связываться с C1q, а также модулировать ассоциацию терминальных компонентов комплемента в мембраноатакующий комплекс. Предложенный метод ИФА позволяет определять ингибирование комплемента сурамином на стадии связывания C1q с иммунными комплексами. Другой полианионный ингибитор комплемента - гепарин действует на систему комплемента по крайней мере на трех стадиях каскада активации [21]. И в этом случае метод ИФА позволяет оценить константу взаимодействия гепарина исключительно с C1q. Для сурамина была получена константа ингибирования, равная 411 ± 29 мкг/мл (или $0,287 \pm 0,020$ мМ), а соответствующая константа для гепарина - $36,4 \pm 1,7$ мкг/мл (или $2,28 \pm 0,10$ мкМ), т.е. связывание гепарина с C1q в 10 раз лучше, чем сурамина, в весовом отношении или в 100 раз лучше - в молярном (411 ± 29 мкг/мл или $0,287 \pm 0,020$ мМ).

Определение механизма действия ингибиторов на конкретных стадиях каскада комплемента важно, но не менее важным является возможность видеть торможение действия комплемента под влиянием ингибитора на уровне целого организма. До сих пор не были описаны простые и удобные животные модели для испытания ингибиторов комплемента. Предложено использовать морских свинок [8], которым внутривенно вводят кроличью иммунную сыворотку, содержащую антитела к эритроцитам морской свинки. В результате такого введения часть животных гибнет, после забоя всей группы животных проводится оценка степени кровоизлияния в легкие. Кровоизлияние наблюдается у всех животных группы.

Для изучения способности веществ тормозить действие комплемента за две минуты до введения иммунной сыворотки животным также внутривенно вводят тестируемое вещество. По отмене гибели животных и снижения степени кровоизлияния в легкие судят об эффективности ингибирующего действия вещества на комплемент *in vivo*. Недостатком этого способа является относительная дороговизна морских свинок, отсутствие простого однозначного ответа (не все животные погибают), необходимость приготовления дополнительно иммунной сыворотки с достаточно высоким титром и необходимость проведения дополнительных исследований степени кровоизлияния в легкие у экспериментальных животных.

Ранее был описан феномен быстрой гибели мышей после парентерального введения сыворотки крови норки [9], который был объяснен высокой активностью комплемента норки. Обнаружено присутствие в сыворотке норки антител к эритроцитам мыши, необходимых для их лизиса под действием комплемента норки по классическому и альтернативному путям. Частичная декомплементизация сыворотки норки с помощью зимозана полностью защищает животных от гибели [10].

Было проведено изучение действия сурамина и гепарина на гибель мышей в результате парентерального введения им сыворотки норки. При этом в опытах одновременно (в одном эксперименте за 2 мин до введения сыворотки) с сывороткой норки мышам вводили соответствующий ингибитор (табл. 2). Как следует из данных, приведенных в табл. 2, введение 10 мг ингибиторов на мышь полностью защищает животных. Изучение дозозависимости защиты животных под действием ингибиторов показало, что выживание части мышей начинает наблюдаться при введении 0,1 мг на мышь гепарина или 1 мг на мышь сурамина. Если учесть общий объем крови мыши 1-2 мл и 1 мл вводимого физиологического раствора, содержащего ингибитор и сыворотку норки, то достигаемые концентрации ингибиторов в условиях частичной гибели животных соответствуют константам ингибирования, полученным в опытах *in vitro* (см. табл. 1).

Таблица 2. Отмена гибели мышей от введения сыворотки норки ингибиторами комплемента

№ опыта	Кол-во вводимой сыворотки норки, мл	Ингибитор	Кол-во ингибитора, мг/мышь	Способ введения	Число погибших мышей/общее число мышей
1	0,06	нет (контроль)	0		3/6
	0,06	гепарин	10	одновременно	0/6
2	0,08	нет (контроль)	0		5/5
	0,08	гепарин	10	одновременно	0/5
3	0,08	нет (контроль)	0		4/5
	0,08	гепарин	10	за 2 мин	1/5
4	0,08	нет (контроль)	0		5/5
	0,08	гепарин	10	одновременно	0/5
	0,08	гепарин	5	одновременно	0/5
	0,08	гепарин	3	одновременно	0/5
	0,08	гепарин	2,5	одновременно	0/5
	0,08	гепарин	0,3	одновременно	0/5
	0,08	гепарин	0,1	одновременно	1/5
5	0,08	нет (контроль)	0		5/5
	0,08	сурамин	10	одновременно	0/5
	0,08	сурамин	9	одновременно	0/5
	0,08	сурамин	3	одновременно	0/5
	0,08	сурамин	1	одновременно	3/5
	0,08	сурамин	1	одновременно	4/5
	0,08	сурамин	0,3	одновременно	5/5
	0,08	сурамин	0,1	одновременно	5/5

ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА *IN VITRO* И *IN VIVO*

Таким образом, действие гепарина в опытах *in vitro* и *in vivo* по сравнению с сурамином в 10 раз сильнее в весовом соотношении. Такая корреляция свидетельствует о том, что в опытах на мышах причиной их гибели в результате введения сыворотки норки является действие комплемента, а ингибирование последнего приводит к выживанию животных.

Работа поддержана грантом РФФИ 99-04-48793.

ЛИТЕРАТУРА

1. Makrides S.C. (1998) *Pharmacological Reviews*, **50**, 59-87.
2. Sahu A., Lambris J.D. (2000) *Immunopharmacology*, **49**, 133-148.
3. Козлов Л.В., Сизой М.Н., Зинченко А.А., Левковский А.В. (1986) *Биохимия*, **51**, 707-718.
4. Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С., Сутовская Н.С. (1985) *Биоорг. химия*, **11**, 762-768.
5. Козлов Л.В., Лебедева Т.В. (1998) *Биоорг. химия*, **24**, 350-355.
6. 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**, 817-824.
7. Козлов Л.В., Лахтин В.М., Баталова Т.Н., Гузова В.А., Дьяков В.Л., Романов С.В. (2000) *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, **41**, № 6. Приложение, 88-90.
8. Higgins P.J., Ko J.-L., Lobell R., Sardonini C., Alessi M.K., Yeh C.G. (1997) *J. Immunol.*, **158**, 2872-2881.
9. Белкин З.П. (1994) *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, №9, 290-291.
10. Белкин З.П., Козлов Л.В., Андина С.С., Мишин А.А., Гузова В.А., Дьяков В.Л. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 373-377.
11. Getty D., Raykundalia C., Houba V. (1983) *WHO IMM/PIR*, № 83.1.
12. Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Баталова Т.Н., Гузова В.А. (1999). *Бюллетень изобретений*, № 10, Патент 2128509.
13. Ouchterlony O., Nilsson L.-A. (1978) *Handbook of Experimental Immunology*, Oxford: Blackwells, **1**, 19.1-19.44.
14. Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Баталова Т.Н., Гузова В.А., Лысакова С.В. (2000) Патент 2144676. *Бюллетень изобретений*. № 2. 20.01.2000.
15. Schumaker V.N., Caicott M.A., Spiegelberg H.L., Muller-Eberhardt H.J. (1976) *Biochemistry*, **15**, 5175-5181.
16. Козлов Л.В., Сизой М.Н., Зинченко А.А., Иванов А.Е., Зубов В.П. (1984) *Биоорг. химия*, **10**, 1629-1638.
17. Козлов Л.В., Зинченко А.А., Соляков Л.С., Сизой М.Н., Ищенко А.М., Мартюшин С.В., Андреев С.В. (1983) *Биоорг. химия*, **9**, 1047-1055.
18. Hughes-Jones N.C., Gorick B.D. (1982) *Mol. Immunol.*, **19**, 1105-1112.
19. Lin T.-Y., Fletcher D.S. (1978) *Immunochemistry*, **15**, 107-117.
20. Saez C., Thielens N.M., Bjes E.S., Esser A.F. (1999) *Biochemistry*, **38**, 6807-6816.
21. Ekre H.-P., Naparstek Y., Lider O., Hyden T., Hagermark O., Niksson T., Vlodavsky I., Cohen I. (1992) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **313**, 329-340.

Поступила 14.12.01

THE EFFECTS OF INHIBITORS ON COMPLEMENT *IN VITRO* AND *IN VIVO*:
ELISA ANALYSIS OF INHIBITION OF A SUBCOMPONENT
C1Q AND INHIBITION OF COMPLEMENT ACTION
ON THE ANIMAL MODEL.

L.V. Kozlov, Z.P. Belkin, A.M. Bichucher, T.N. Batalova, V.L. D'yakov

Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health
of Russian Federation, ul. Admirala Makarova, 10; Moscow, 125212 Russia; tel.: (095) 452-38-01;
e-mail: L.V.Kozlov@mtu-net.ru

Methods of analysis of inhibition of complement system *in vitro* and *in vivo* have been developed for study of effects of medical drugs on the complement. The first one, ELISA method, for determination of inhibition of the first stage of complement activation includes binding of C1q subcomponent to immunoglobulin. The second method is based on capacity of mink serum to kill mice at the intravenous administration due to the action of mink complement. The effects of heparin, known anticoagulant, and suramin, used for treatment of trypanosomiasis, have been studied using these systems. The inhibition constants of binding suramin and heparin binding evaluated by the first method C1q were $411 \pm 29 \mu\text{g/ml}$ (or $0,287 \pm 0,020 \mu\text{mole/l}$) and $36,4 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$ (or $2,28 \pm 0,10 \mu\text{mole/l}$), respectively. This indicates that heparin binding with C1q in 10 times is higher, than that for suramin (as weight ratio) or 100 times higher in molar ratio. Administration of 3 mg of suramin or 0,3 mg of heparin to mice protected them against lethal action of intravenously injected 0,08 ml of mink serum. Blood concentrations of these compounds approximately correspond to inhibition constants for C1q binding, obtained using *in vitro* method.

Key words: complement, component C1q, inhibition, suramin, heparin, ELISA, mink serum, mouse, toxicity