

# Ингибирование классического пути активации системы комплемента путём блокирования C1q гипоксеном

Шойбонов Б.Б., Баронец В.Ю., Онтобоев А.Н., Панченко Л.Ф.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН  
Национальный научный центр наркологии Минздрава РФ  
ФГБУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» РАМН  
e-mail: shoibonov@mail.ru

*Неконтролируемая активация системы комплемента (СК) является одним из патогенетических звеньев при различных хронических заболеваниях иммунных комплексов и острых состояниях, таких, как острый инфаркт миокарда, гиперострое отторжение трансплантата. Настоящая работа посвящена исследованию механизма действия специфического ингибитора классического пути СК, не затрагивающего антимикробную функцию комплемента, обусловленную альтернативным и лектиновым путями. Гипоксен, лекарственный препарат с антигипоксическим и антиоксидантным действием, связывается с субкомпонентом C1q как в растворе, так и в иммобилизованном состоянии и ингибирует гемолитическую активность C1q ( $IC_{50}=1,7 \times 10^{-8}$  М). В связывании гипоксена с C1q в составе C1 компонента вовлекается коллагеноподобная часть молекулы, и это приводит к диссоциации комплекса как в растворе, так и в иммобилизованном состоянии ( $IC_{50}=8,9 \times 10^{-9}$  М). Взаимодействие гипоксена с компонентом C1 не приводит к активации комплемента.*

**Ключевые слова:** система комплемента, гипоксен, субкомпонент C1q, ингибитор C1q

## Введение

Гипоксен — натриевая соль [поли-(2,5-дигидроксибензил)-4-тиосульфокислоты, лекарственный препарат с антигипоксическим и антиоксидантным действием. Полимеризованный фенольный комплекс обладает высокой антирадикальной активностью, препятствует реакции свободнорадикального окисления и образованию перекисей липидов. Препарат обладает высокой электрон-объемной емкостью, связанной с полимеризацией фенольных ядер в орто-положении. Его антигипоксический эффект связан в первую очередь с наличием в его структуре полифенольного убихинонового компонента, участвующего в дыхательной цепи переноса электронов [3].

Система комплемента (СК) играет важную роль в гуморальной защите против микроорганизмов и в инициации иммунного ответа. В настоящее время описано три пути активации СК: классический, альтернативный и лектиновый [8].

Активация СК по классическому пути осуществляется при специфическом связывании C1, первого компонента комплемента, на иммунных комплексах. В состав комплекса C1 входит субкомпонент C1q, узнающий специфический участок на молекуле иммуноглобулина и имеющий уникальную ультраструктуру, а также по две молекулы зимогенов протеиназ трипсинового типа C1r<sub>2</sub> и C1s<sub>2</sub>, превращающихся в ферментативно активные формы после активации на иммунных комплексах. C1-ингибитор (C1-inh) быстро и необратимо связывается с активированными формами C1r и C1s. При диссоциации C1 под действием C1-inh, C1q остается связанным с комплексом антиген-антитело и проявляет различные рецептор-опосредованные биологические функции, такие как усиление фагоцитоза, продукция супероксидов нейтрофилами, синтез иммуноглобулинов, хемотаксис, клеточная адгезия и регуляция функции тромбоцитов. Все клетки крови

связывают C1q, рецепторы этой молекулы выявлены также на эндотелиальных и эпителиальных клетках, фибробластах и клетках гладкой мускулатуры [8].

Настоящая работа посвящена исследованию механизма действия на систему комплемента препарата гипоксен.

## Материалы и методы

В работе использовали веронал, мединал фирмы «Ser-va» (ФРГ), Трис — «Merck» (ФРГ), ЕДТА — «Sigma» (США), человеческий сывороточный альбумин — «Reanal» (Венгрия), остальные реактивы (квалификации не ниже ч.д.а.) отечественного производства. Гипоксен производства фармацевтического предприятия ЗАО «Корпорация Олифен», г.Москва

*Приготовление эритроцитов барана, сенсibilизированных эритроцитов барана (ЕА), комплекса ЕАС1q, ЕАС1, ЕАС4b, реагентов, R1q, R1, R2, R3, R4, изотонического вероналового буфера, рН 7,4 (VBS), буфера, содержащего ионы Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (VBS<sup>2+</sup>), определение гемолитической активности компонентов C1q, C1, C2, C3 и C4 описано в работе [8]. Выделение C1q, приготовление реагента R1q описано в работе [2,6].*

*Влияние гипоксена на активность СК. Эффект определяли по снижению гемолиза по классическому пути разбавленной сыворотки крови человека после её преинкубации с 0,1—0,8 мкг гипоксена в течение 15 мин при 37°C и внесения 200 мкл суспензии ЕА (1,5×10<sup>8</sup> кл/мл) с последующей 30-минутной инкубацией. После инкубации в каждую пробу добавляли по 2,5 мл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли степень гемолиза по величине A<sub>412</sub> супернатанта. Контрольная проба не содержала гипоксена. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контрольной свидетельствовал об ингибировании СК.*

*Определение связывания гипоксена с EA.* 200 мкл суспензии EA инкубировали с 1—8 мкг гипоксена в объеме 500 мкл в течение 15 мин. После инкубации центрифугировали 5 мин при 1500 g, декантировали, осадок EA ресуспендировали в 500 мкл разведенной сыворотки в VBS<sup>2+</sup> и инкубировали 30 мин, останавливали реакцию и определяли степень гемолиза, как описано выше.

*Влияние преинкубации гипоксена с субкомпонентом C1q.* 25—200 нг гипоксена инкубировали 20 мин при 37°C с подобранной концентрацией C1q в объеме 80 мкл, доведенном буфером VBS<sup>2+</sup>. После инкубации собирали гемолитическую систему, добавляя 200 мкл суспензии EA и 220 мкл разбавленного реагента R1q. Инкубировали 30 мин при 37°C и определяли степень лизиса, как описано выше.

*Определение связывания гипоксена с комплексом EAC1q.* Комплекс EAC1q с ограниченным числом эффективных молекул C1q готовили следующим образом: 200 мкл суспензии EA инкубировали с подобранным количеством C1q в течение 20 мин при 37°C, комплекс EACq отделяли центрифугированием, осевший комплекс ресуспендировали в 200 мкл VBS<sup>2+</sup>. К комплексу EAC1q добавляли 0,1—0,4 мкг гипоксена, объем доводили до 500 мкл буфером и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. После инкубации с эффектором добавляли 500 мкл VBS<sup>2+</sup>, комплекс EAC1q-I отделяли центрифугированием, декантировали и осадок ресуспендировали в гемолитической системе с реагентом R1q. После 30 мин инкубации при 37°C определяли степень лизиса, как описано выше.

*Влияние гипоксена на связывание C1 с EA.* 0,1—0,4 мкг препарата инкубировали 15 мин при 37°C с подобранной концентрацией R4 (сыворотка морской свинки, истощенная по компоненту C4, источник компонента C1) и 200 мкл суспензии EA в общем объеме 500 мкл, доведенном VBS<sup>2+</sup>. Реакцию останавливали добавлением 500 мкл холодного раствора 0,15 M NaCl, центрифугировали 5 мин при 1500 g, декантировали и к осадку EAC1 добавляли 0,5 мл разведенного реагента R1. Тщательно перемешивали встряхиванием и инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации определяли степень лизиса при A<sub>412</sub>, как описано выше.

*Влияние гипоксена после формирования комплекса EAC1.* Комплекс EAC1 получали, как описано выше. К 200 мкл суспензии комплекса EAC1 добавляли 0,05—0,8 мкг гипоксена и 50 мкл реагента R1, объем доводили до 0,5 мл буфером VBS<sup>2+</sup> и инкубировали 30 мин при 37°C. Определяли степень лизиса, как описано выше. Контрольные пробы не содержали гипоксена.

*Определение активации классического пути препаратом гипоксен.* 3,3 мкл сыворотки крови человека и 1,3 мкг/мл гипоксена в VBS<sup>2+</sup> инкубировали 0 и 15 мин при 37°C и отбирали аликвоты для определения гемолитической активности компонентов C1, C2 и C4 в пробе.

*Влияние гипоксена на связывание C4b с EA.* 0,1—0,4 мкг гипоксена инкубировали 15 мин при 37°C с подобранной концентрацией R2 (сыворотка крови человека, истощенная по компоненту C2, источник компонентов C1 и C4) и 200 мкл суспензии EA в общем объеме 500 мкл, доведенном VBS<sup>2+</sup>. Реакцию останавливали добавлением 500 мкл холодного раствора 0,15 M NaCl, центрифугировали 5 мин при 1500 g, декантировали и к осадку EAC4b добавляли 0,5 мл разведенного реагента R4. Далее определяли степень гемолиза после инкубации, как описано выше.

*Влияние гипоксена после формирования комплекса EAC4b.* К 200 мкл суспензии комплекса EAC4b добавляли 0,1—1,0 мкг препарата и разведенного реагента R4 в объеме 0,5 мл, доведенном VBS<sup>2+</sup>, и инкубировали 30 мин при 37°C. Определяли степень лизиса комплекса EAC4b после центрифугирования. Контрольные пробы не содержали гипоксена.

*Влияние сывороточного альбумина человека на антикомplementное действие гипоксена.* 0,4—6,2 мг альбумина крови человека в 500 мкл гемолитической системы в присутствии 0,6 мкг гипоксена инкубировали 30 мин при 37°C. В первом контроле отсутствовал альбумин (контроль гипоксена), во втором контроле отсутствовали и гипоксен, и альбумин (контроль системы). После инкубации определяли степень лизиса, как описано выше.

*Влияние альбумина на связывание гипоксена с EAC1q.* 40 мкл альбумина крови человека (40 мг/мл) инкубировали 20 мин при комнатной температуре с 40 мкл раствора гипоксена (10 мкг/мл). В первом контроле отсутствовал альбумин (контроль гипоксена), во втором — альбумин и гипоксен (контроль системы). После инкубации отбирали пробы по 20 мкл и добавляли к 200 мкл суспензии EAC1q, объем доводили до 500 мкл буфером VBS<sup>2+</sup>, повторно инкубировали 15 мин при 37°C. Образовавшийся комплекс EAC1q-I отделяли центрифугированием и последующей декантацией. Осадок ресуспендировали в гемолитической системе с реагентом R1, инкубировали 30 мин при 37°C и определяли степень лизиса, как описано выше.

*Влияние желатина на антикомplementное действие гипоксена.* 5—20 мг желатина в 500 мкл гемолитической системы инкубировали 30 мин при 37°C в присутствии 0,8 мкг/мл гипоксена. В контрольных пробах отсутствовал желатин. Далее определяли степень гемолиза, как описано выше.

*Влияние гипоксена на альтернативный путь компонента.* Инкубировали разбавленную 1:11 сыворотку с 1—8 мкг/мл препарата в течение 20 мин при 37°C и определяли остаточную активность компонента по альтернативному пути с помощью эритроцитов кролика, как описано в работе [1].

## Результаты и их обсуждение

Препарат гипоксена дозо-зависимым образом ингибирует классический путь активации системы комплемента, причем преинкубация сыворотки с препаратом в концентрации до 0,8 мкг/мл не влияет на эффект ингибирования, а при концентрации 0,8 мкг/мл и выше наблюдается незначительное (на 15—19%) усиление эффекта (рис. 1).

Для определения связывания гипоксена с EA, эритроциты были предварительно инкубированы с препаратом, отмыты центрифугированием и ресуспендированы в гемолитической системе с сывороткой. После инкубации определяли степень лизиса. Результаты эксперимента представлены на рис. 1. Связывание гипоксена с EA вызывает ингибирование, дозозависимое до 2,0 мкг/мл, а при 2,0 мкг/мл и выше ингибирование достигает уровня 50%, т.е. наступает насыщение препаратом. Из данных, представленных на рис. 1, видно, что гипоксен при концентрации 1 мкг/мл ингибирует на 90% классический путь активации комплемента, а отсутствие эффекта гипоксена в концентрации до 0,4 мкг/мл, видимо, обусловлено взаимодействием его с белками сыворотки крови.

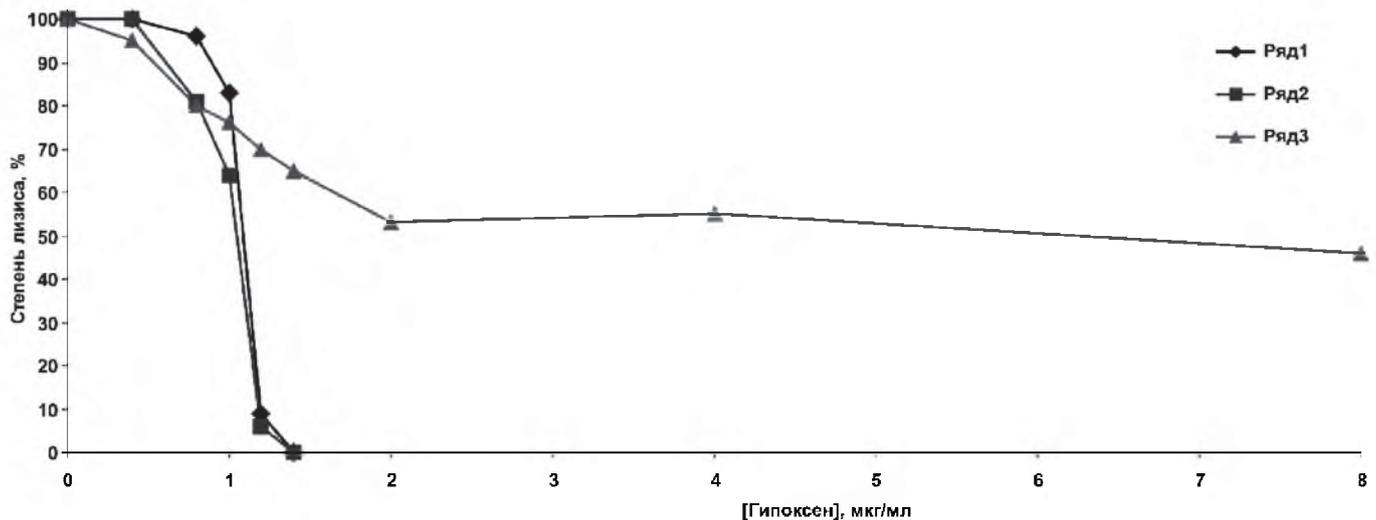


Рис. 1. Влияние гипоксена на классический путь комплемента: ряд 1 — без преинкубации сыворотки с гипоксеном; ряд 2 — преинкубация сыворотки с гипоксеном 15 мин при 37°C; ряд 3 — связывание гипоксена с EA и ингибирование классического пути комплемента

Для установления механизма действия гипоксена на классический путь активации системы комплемент было изучено влияние препарата на отдельные компоненты и стадии комплементного каскада. Так, исследовалось влияние гипоксена на субкомпонент C1q. Для этого функционально чистый C1q в подобранной концентрации предварительно инкубировали 20 мин с гипоксеном и определяли остаточную активность C1q, добавляя EA и реагент R1q. После инкубации центрифугировали и определяли степень гемолиза по величине  $A_{412}$  супернатанта. Контрольная проба не содержала гипоксена. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контрольной свидетельствовал о воздействии гипоксена на C1q.

Измеренную величину (степень лизиса —  $y$ ) использовали для расчета значения  $Z$  (число эффективных молекул C1q в данном случае), которое определяется по формуле:

$$Z = \ln[(H-R)/(H-X)],$$

где  $H$ ,  $R$  и  $X$  — величины оптической плотности при  $A_{412}$  гемолитической системы при полном лизисе, в контроле (без титруемого компонента) и в опытной пробе соответственно.

Для ингибирования активности субкомпонента C1q требуется предварительная инкубация гипоксена, причем эффективность возрастает почти в 30 раз по сравнению с цельной сывороткой. 100%-ное ингибирование наблюдается при концентрации гипоксена 0,4 мкг/мл, тогда как в опытах с цельной сывороткой при такой концентрации гипоксена не наблюдалось эффекта.

Результаты исследования убедительно свидетельствуют о том, что гипоксен оказывает дозозависимое ингибирующее действие на субкомпонент C1q (рис. 2).

Константу ингибирования  $K_i$  рассчитывали по линейному уравнению:

$$1/Z_i = [I] / (Z_0 \times K_i) + 1/Z_0,$$

строая график зависимости  $1/Z_i$  от  $[I]$ . При этом точка пересечения графика с осью абсцисс соответствует значению  $K_i = 1,7 \times 10^{-8}$  М.

Было исследовано влияние гипоксена после связывания субкомпонента C1q с иммунными комплексами (EA). Для этого комплекс EAC1q инкубировали с препаратом гипоксена и образовавшийся EAC1q-I осаждали центрифугированием, ресуспендировали в гемолитической системе с реагентом R1q. После инкубации определяли сте-

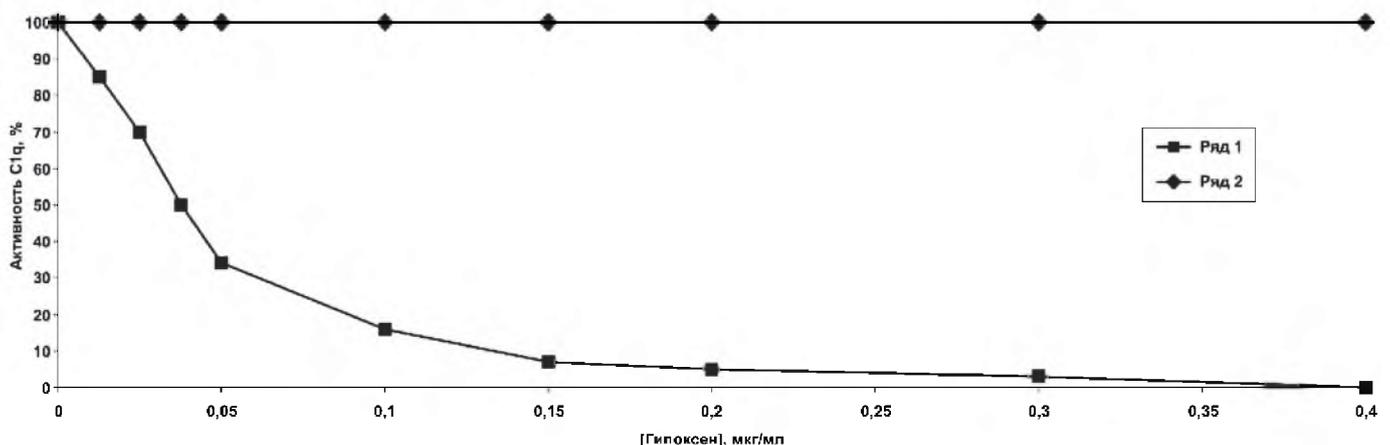


Рис. 2. Зависимость инактивации C1q от концентрации гипоксена: ряд 1 — 20 мин преинкубации гипоксена с C1q; ряд 2 — без преинкубации гипоксена с C1q

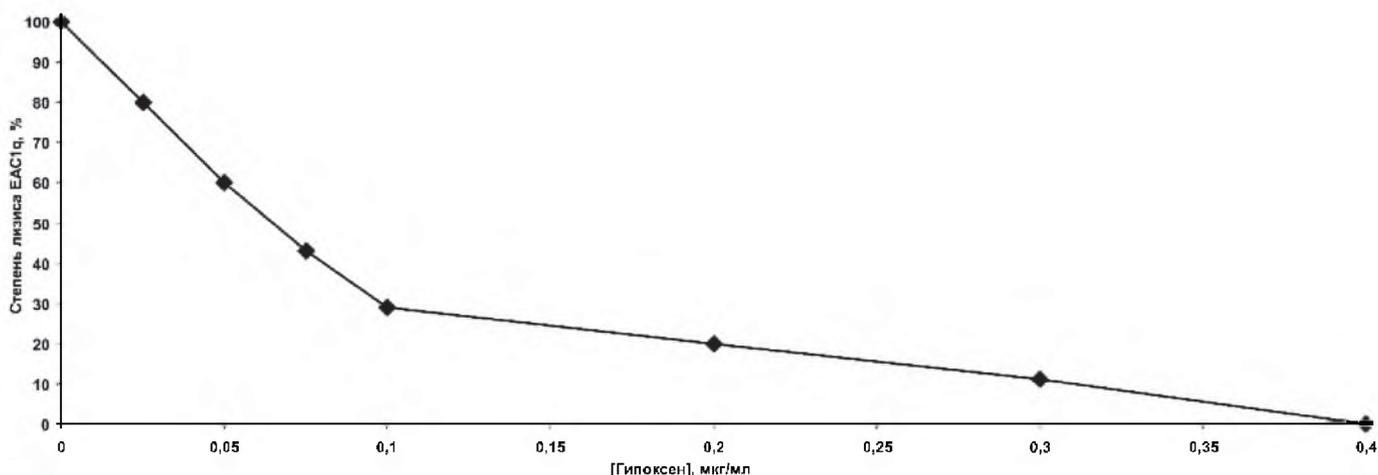


Рис. 3. Связывание гипоксена с комплексом EAC1q и ингибирование гемолиза

пень лизиса (рис. 3). Эксперименты убедительно подтверждают необратимое связывание гипоксена с иммобилизованной молекулой C1q и тем самым — ингибирование формирования комплекса EAC1 с  $K_i = 3,7 \times 10^{-8}$  М.

Таким образом, инактивация субкомпонента C1q при предварительной инкубации в два раза выше, чем после формирования комплекса EAC1q. Возможно, что во взаимодействии гипоксена с молекулой C1q задействованы как глобулярная, так и коллагеноподобная области.

Следующим этапом исследований являлось формирование и функционирование комплекса EAC1. Результаты исследования свидетельствуют о том, что гипоксен оказывает дозозависимое ингибирующее действие на формирование комплекса EAC1 ( $K_i = 1,5 \times 10^{-6}$  М) (табл. 1).

Более выраженное действие гипоксена наблюдается после формирования комплекса EAC1 ( $K_i = 6,76 \times 10^{-7}$  М) (табл. 2).

Были проведены исследования по обратимости связывания гипоксена с комплексом EAC1. Для этого комплекс EAC1 предварительно инкубировали с гипоксеном, образовавшийся комплекс EAC1-I отделяли центрифугирова-

нием и определяли активность в гемолитической системе с реагентом R1 ( $K_i = 8,9 \times 10^{-9}$  М) (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гипоксен взаимодействует с компонентом C1 как в растворе, так и в иммобилизованном состоянии на EA. Взаимодействие гипоксена с компонентом C1 через его субкомпонент C1q может приводить к активации компонента C1, как это было показано для полифенол-богатого гликопротеина из табачных листьев (TGP) и подобного белка из конденсата сигаретного дыма (TGP-S) [4]. Поэтому были проведены эксперименты для исключения активации классического пути комплемента гипоксеном.

Эксперименты проводили следующим образом. Смешивали разбавленную сыворотку с подобранной концентрацией гипоксена и инкубировали 15 мин при 37°C. Контрольный опыт не содержал гипоксена. После инкубации отбирали аликвоты для определения активности компонентов C1, C2 и C4 (табл. 4).

Проведенные исследования показали, что связывание гипоксена с C1-компонентом приводит к его инактивации

Таблица 1

#### Ингибирование образования комплекса EAC1 гипоксеном

Состав системы	[Гипоксен], мкг/мл	Степень лизиса EAC1, %
EA + C1	0	100
EA + C1	0,2	81
EA + C1	0,4	76
EA + C1	0,6	64
EA + C1	0,8	44

Таблица 2

#### Влияние гипоксена после образования комплекса EAC1

Состав системы	[Гипоксен], мкг/мл	Количество C1 на EA, %
EAC1	0	100
EAC1	0,05	82
EAC1	0,1	66
EAC1	0,15	42
EAC1	0,2	31
EAC1	0,4	15
EAC1	0,6	8
EAC1	0,8	4

Связывание гипоксена с EAC1 и ингибирование активности C1

Состав системы	[Гипоксен], мкг/мл	Количество C1 на EA,%
EAC1	0	100
EAC1	0,05	80
EAC1	0,1	53
EAC1	0,15	30
EAC1	0,2	5
EAC1	0,4	1
EAC1	0,6	0,7
EAC1	0,8	0,4

Потребление компонентов C1, C2 и C4 (%) при инкубации с гипоксеном (1,3 мкг/мл)

Компоненты	Время инкубации, мин	
	0 мин	15 мин
C1	93	56
C2	94	103
C4	102	104

ции и не вызывает потребления компонентов C4 и C2. Инактивация C1-компонента должна приводить к ингибированию тех стадии комплементного каскада, в которых участвует данный комплекс. Это активация компонентов C4 и C2 ферментом C1s с образованием C3-конвертазы классического пути (C4bC2a).

Стадия формирования комплекса EAC4b была исследована путем инкубации сенсibilизированных эритроцитов (EA) с реагентом R2 в присутствии гипоксена. Количество иммобилизованных молекул C4b на EA определяли после центрифугирования и ресуспендирования в гемолитической системе, содержащей реагент R4. Оказалось, что гипоксен менее эффективно подавляет данную стадию и не влияет после формирования комплекса EAC14b (рис. 4). Подобные результаты могли быть обусловлены тем, что в модельной тестовой системе при формировании комплекса EAC14b лимитируется концентрация молекул C4b, иммобилизованных на EA, в то время как компонент C1 в реагенте R2 содержится в избытке.

Поэтому мы наблюдаем меньший эффект ингибирования гипоксеном формирования комплекса EAC14b.

Отсутствие эффекта после формирования комплекса EAC14b могло быть обусловлено взаимодействием гипоксена с белками сыворотки крови в реагенте R4. Аналогичный результат был получен в эксперименте с влиянием гипоксена при дефиците субкомпонента C1q (рис. 2). Учитывая то, что около 50% белков сыворотки приходится на долю альбумина, нами были проведены исследования влияния альбумина на ингибирующее действие гипоксена на комплемент.

Эксперименты проводили следующим образом. В присутствии гипоксена, оказывающего ингибирование на уровне 40%, добавляли раствор человеческого альбумина в возрастающих концентрациях и проводили гемолиз EA сывороткой морской свинки. Использовали две контрольные системы — гемолитическая система с гипоксеном и без него. Результаты эксперимента представлены в табл. 5.

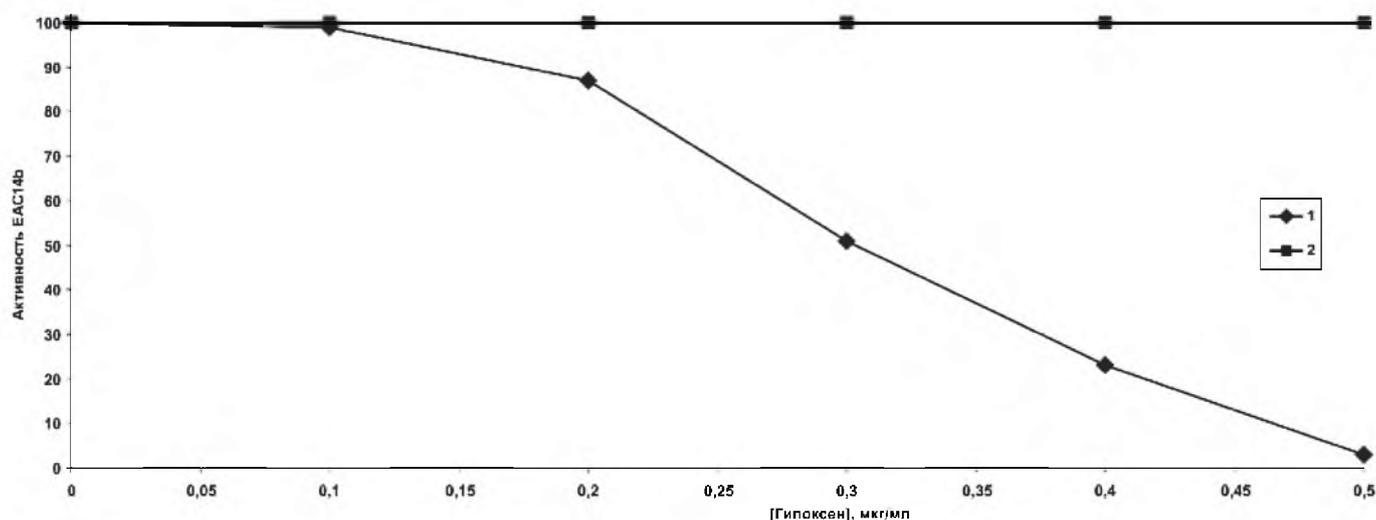


Рис. 4. Влияние гипоксена на образование и функционирование комплекса EAC14b: 1 — на образование комплекса EAC14b; 2 — после образования комплекса EAC14b

В результате проведенных исследований получены данные, которые свидетельствуют о связывании альбумина с гипоксеном. Отмена ингибирования активности компонента гипоксеном в присутствии альбумина сыворотки крови человека наблюдается при концентрации  $1,15 \times 10^{-5}$  М. Учитывая то, что гипоксен необратимо связывается с C1q в составе комплекса C1, иммобилизованном на EA, и инактивирует компонент C1, нами было исследовано влияние альбумина на этой стадии. Для этого предварительно гипоксен инкубировали с альбумином и аликвоту отбирали в систему с комплексом EAC1, инкубировали для связывания гипоксена с EAC1. Образовавшийся комплекс EAC1-I отделяли центрифугированием и ресуспендировали в гемолитической системе с реагентом R1. Полученные результаты представлены в табл. 6.

При концентрации гипоксена  $2,55 \times 10^{-7}$  М наблюдается почти 90% ингибирование активности комплекса EAC1, что совпадает с данными, приведенными в табл. 2, подтверждая необратимый характер взаимодействия гипоксена с компонентом C1 комплемента. Концентрация альбумина  $1,15 \times 10^{-5}$  М оказалась недостаточной для полной отмены связывания гипоксена с комплексом EAC1 или же в составе гипоксена содержатся компоненты, которые не взаимодействуют с альбумином сыворотки крови человека.

Таким образом, для эффективного воздействия гипоксена на систему комплемента при состояниях неконтро-

лируемой активации необходимо учитывать взаимодействие альбумина с препаратом гипоксена.

Для определения участка молекулы C1q, который взаимодействует с гипоксеном, были проведены исследования влияния желатина на взаимодействие гипоксена с комплементом. Были проведены предварительные исследования влияния самого желатина на комплемент-обусловленный лизис. Обнаружено, что раствор желатина до концентрации 20 мг/мл не влияет на систему комплемента, а свыше 20 мг/мл оказывает ингибирующий эффект. Взаимодействие желатина с гипоксеном анализировали в дальнейшем в гемолитической системе с фиксированной концентрацией гипоксена в присутствии возрастающих концентраций желатина. Оказалось, что желатин отменяет эффект гипоксена до концентрации 0,3 мг/мл, а свыше этой концентрации наблюдается эффект ингибирования (табл. 7). Хотя в предварительных исследованиях желатин до 20 мг/мл не влиял на гемолиз EA комплементом. Следовательно, взаимодействие желатина с гипоксеном усиливает его способность подавлять комплемент опосредованный гемолиз.

Из результатов данного эксперимента можно предполагать, что гипоксен взаимодействует с субкомпонентом C1q в области коллагеноподобной части молекулы.

На альтернативный путь комплемента гипоксен до 8 мг/мл не оказывает влияния.

Таблица 5

**Влияние человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) на антикомплементное действие гипоксена (1,2 мкг/мл)**

Система	[Гипоксен], мкг/мл	ЧСА, мг/мл	Степень лизиса, %
EA + комплемент	1,2	0,8	108
EA + комплемент	1,2	1,6	102
EA + комплемент	1,2	3,2	110
EA + комплемент	1,2	6,4	109
EA + комплемент	1,2	12,8	95
EA + комплемент	1,2	—	60
EA + комплемент	—	—	100

Таблица 6

**Влияние ЧСА на связывание гипоксена с комплексом C1, иммобилизованным на EA**

Система	[Гипоксен], моль/л	[ЧСА], моль/л	Инкубация, центрифугирование и ресуспендирование в гем-системе с R1	Степень лизиса, %
EAC1	$2,55 \times 10^{-7}$	$1,15 \times 10^{-5}$		84(±3)
EAC1	$2,55 \times 10^{-7}$	—	8 (±2)	
EAC1	—	—	100 (±3)	

Таблица 7

**Влияние 10% желатина на антикомплементное действие гипоксена**

Система	[Гипоксен], мкг/мл	[Желатин], мг/мл	Степень лизиса, %
EA + комплемент	0,8	0,1	102
EA + комплемент	0,8	0,2	102
EA + комплемент	0,8	0,3	106
EA + комплемент	0,8	0,4	95
EA + комплемент	0,8	0,6	90
EA + комплемент	0,8	0,8	84
EA + комплемент	0,8	—	71
EA + комплемент	—	—	100

## Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об обнаружении специфического ингибитора субкомпонента C1q первого компонента классического пути активации системы комплемента.

В настоящее время разработки специфических ингибиторов C1q ведутся в трех направлениях:

1. Пептиды, имитирующие последовательность аминокислот в Fc-фрагменте IgG и связывающиеся с глобулярным доменом молекулы C1q [5];

2. Пептиды, блокирующие C<sub>H</sub>2 домен в Fc-фрагменте IgG, что приводит к ингибированию связывания C1q с иммунными комплексами [7];

3. Рекомбинантные белки, рецепторы C1q, взаимодействующие по коллагеновой части молекулы [10].

Недостатком первого направления является возможность дополнительной системной активации комплемента, что может усугубить состояние неконтролируемой активации системы. Второе и третье направление являются дорогостоящими, и, кроме того, белковые препараты не стабильны при хранении.

Учитывая вышесказанное, обнаруженный нами специфический ингибитор C1q, гипоксен, имеет большую перспективу в терапии заболеваний, сопровождающихся неконтролируемой активацией классического пути комплемента. При применении этого ингибитора в клинике необходимо учитывать возможный побочный эффект, связанный с участием C1q в клиренсе ИК, а также в процессе апоптоза.

## Список литературы

1. Козлов Л.В., Соляков Л.С. // Биоорган. химия. — 1982. — Т. 8, №3. — С. 342—348.
2. Козлов Л.В., Шойбонов Б.Б., Иванов А.Е. и др. Ступенчатая диссоциация субкомпонентов C1, первого компонента комплемента человека, при активации на аффинном сорбенте // Биохимия. — 1989. — Т. 54, №10. — С. 1745—1751.
3. Смирнов В.С., Кузьмич М.К. Гипоксен. — СПб. — М.: ФАРМиндекс, 2001. — 104 с.
4. Koethe S.M., Nelson K.E., Becker C.G. Activation of the classical pathway of complement by tobacco glycoprotein (TGP) // J. Immunol. — 1995. — Vol. 155. — P. 826—835.
5. Kojima T., Del Caprio C.A., Tajiri H. et al. Inhibition of complement-mediated immune hemolysis by peptides derived from the constant domain of immunoglobulin // Transplantation — 1999. — Vol. 67, №4. — P. 637—638.
6. Ivanov A.E., Shoibonov B.B., Kozlov L.V., Zubov V.P. et al. Inorganic Supports Coated with N-Substituted Polyacrylamids: Application to Biospecific Chromatography of Proteins // Biomedical Chromatography. — 1991. — Vol. 5. — P. 90—93.
7. Pryer J.P., Levental J.R., Pao W. et al. Synthetic peptides which inhibit the interaction between C1q and immunoglobulin and prolong xenograft survival // Transplantation. — 2000. — Vol. 70, №5. — P. 828—836.
8. Sarma J.V., Ward P.A. The complement system // Cell Tissue Res. — 2011. — Vol. 343. — P. 227—235.
9. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V. et al. Oxiagin from the Naja oxiana cobra venom is the first reprotolysin inhibiting the classical pathway of complement // Mol. Immunol. — 2005. — Vol. 42. — P. 1141—1153.
10. Van den Berg R.H., Faber-Krol M., van Es L.A., Daha M.R. Regulation of the function of the first component of complement by human C1q receptor // Eur. J. Immunol. — 1995. — Vol. 25. — P. 2206—2210.

Поступила 7.03.2013

## *Inhibition of the classical pathway of complement activation by blocking C1q with gipoxenum*

Shoibonov B.B., Baronets V.Y., Ontoboev A.N., Panchenko L.F.

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, Moscow, Russia  
National Research Center for Addictions of the Russian Ministry of Public Health, Moscow, Russia  
Anokhin Institute of Normal Physiology of RAMS, Moscow, Russia  
E-mail: shoibonov@mail.ru

*Uncontrolled activation of the complement system (CS) is one of the pathogenetic mechanisms involved in various chronic diseases of immune complexes and acute conditions such as acute myocardial infarction and hyperacute graft rejection. In the present work we studied mechanism of action of a specific inhibitor of the classical complement pathway, not affecting CS antimicrobial function associated with alternative and lectin pathways. Hypoxenum is a drug with antioxidant and anti-hypoxic activity which binds C1q subcomponent in solution and in immobilized state and inhibits C1q hemolytic activity ( $IC_{50}=1,7 \times 10^{-8}$  M). Hypoxenum binding to C1q included in C1 component involves the collagen-like moiety, which leads to dissociation of the complex either in solution or in immobilized state ( $IC_{50}=8,9 \times 10^{-9}$  M). Hypoxenum-C1 interaction does not cause CS activation.*

**Key words:** complement system, hypoxenum, C1q subcomponent, C1q inhibitor