

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ, ПРОТИВОАЛЛЕРГИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НА КОМПЛЕМЕНТ. ИНГИБИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ СУБКОМПОНЕНТА C1q С МИШЕНЬЮ

А. М. Бичучер, Л. В. Козлов<sup>1</sup>

Разработан метод определения констант ингибирования веществ, действующих на систему комплемента на стадии узнавания “мишени” (иммунных комплексов) первым компонентом комплемента и, тем самым, блокирующих активацию классического пути. Исследована способность ряда лекарственных веществ ингибировать связывание субкомпонента C1q с “мишенью”. Показано, что некоторые из лекарственных веществ обладают выраженной способностью блокировать активацию комплемента. Проведено сравнение констант ингибирования с терапевтическими дозами препаратов. Некоторые из исследованных препаратов (сурамин, деринат, куркумин, гепарин, сульфетрон, слабилен, лизоцим) могут находиться в кровотоке в концентрациях, оказывающих блокирующее действие на комплемент. Метод целесообразно использовать для поиска препаратов, обладающих способностью ингибировать комплемент, а также для изучения побочного действия лекарственных веществ.

**Ключевые слова:** система комплемента, субкомпонент C1q, ингибирование, противовоспалительные свойства

### ВВЕДЕНИЕ

Различные экзогенные вещества могут влиять на систему комплемента [1]. Среди них имеются лекарственные средства. Изучение действия последних на комплемент имеет несколько важных аспектов. Среди лекарственных средств отсутствует категория препаратов, целенаправленно воздействующих на систему комплемента, хотя необходимость в таких препаратах имеется (например, в препаратах, ингибирующих действие комплемента и, тем самым, снижающих риск отторжения трансплантата, или в противовоспалительных препаратах, осуществляющих главным образом торможение реакций комплемента без заметного влияния на циклооксигеназы). Имеются примеры противоположного характера: действие препарата на систему комплемента как побочное с негативными последствиями (например, лекарственная волчанка, вызванная действием апрессина на компонент C4 [12]). Создание препаратов, способных целенаправленно воздействовать на комплемент, ингибируя конкретную стадию каскада его активации, чтобы не нарушать другие его функции, обусловлена целесообразностью применения в медицине новых лекарственных регуляторов системы комплемента. Важными направлениями этих

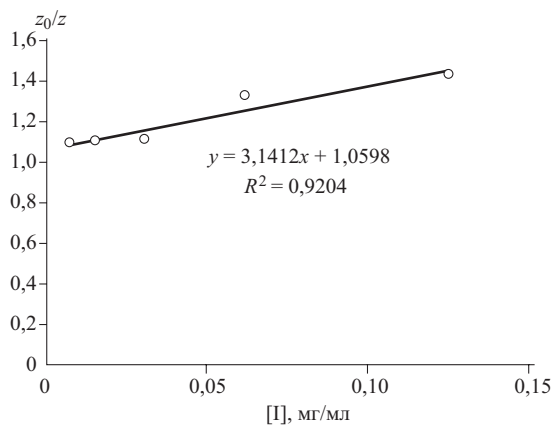
исследований являются поиски ингибиторов комплемента, препятствующих отторжению трансплантата [10,14], способных заменить C1-ингибитор при наследственном ангионевротическом отеке [13], обладающих высокой противовоспалительной активностью для терапии ревматологических заболеваний, диабета и других аутоиммунных расстройств [9].

При разработке средств, целенаправленно воздействующих на систему комплемента, рационально изыскивать их среди имеющихся препаратов, предназначенных для других целей, поскольку это позволяет сократить время, затраченное на необходимые исследования для получения разрешения на применение препарата. С другой стороны, в настоящее время в такие исследования не включены испытания препаратов на возможное побочное негативное действие на систему комплемента.

Для направленного обнаружения действия лекарственных веществ на комплемент целесообразно использовать методы, позволяющие изучать действие эффекторов на систему комплемента на различных стадиях каскада его активации.

Две ключевые стадии каскада активации классического пути комплемента, ингибирование которых существенно для отмены реакций воспаления и литической функции – ингибирование связывания субкомпонента C1q на активаторе [6] и блокирование

<sup>1</sup> ФГУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, 125215, ул. Адмирала Макарова, 10.



Определение константы ингибирования C1q кромогликатом натрия.

образования C3/C5-конвертаз путем акцептирования активированных компонентов C3 и C5 [2,3].

В работе исследовали ингибирование связывания C1q с активатором – иммуноглобулином [6] лекарственными веществами различных групп, выбранных в известной мере произвольно, чтобы показать приемлемость подхода для широкого скрининга препаратов и возможность обнаружения активных соединений среди лекарств, не предназначенных для ингибирования комплемента. Особняком стоят два исследованных вещества: сурамин и куркумин. Сурамин, известный ингибирующим действием на различные этапы каскада активации комплемента [8,11], был изначально создан для лечения трипаносомоза, в нашей стране в настоящее время имеет применение в онкологии [5]. Другим препаратом является куркумин – БАД в нашей стране и широко известный препарат в народной индийской медицине, оказывающий противовоспалительное действие. В этой работе он был взят также по причине его

#### Константы ингибирования связывания комплемента лекарственными веществами

Исследуемое средство	$K_i$ C1q, мкг/мл	Необходимая доза, мг	Максимальная терапевтическая доза, мг
Сульфетрон	$0,06 \pm 0,01$	0,3	1500
Мирамистин	$0,10 \pm 0,03$	0,5	?
Сурамин	$0,41 \pm 0,03$	2	1600
Деринат	$4,45 \pm 0,19$	20	75
Куркумин	$5,29 \pm 0,17$	27	665
Лизоцим	$6,71 \pm 1,76$	35	150
Диклофенак натрия	$19,0 \pm 2,9$	95	50
Слабилен	$25,5 \pm 1,64$	128	167
Гепарин	$36,4 \pm 1,7$	180	280
Мелоксикам	$116 \pm 18$	580	15
Кромогликат натрия	$349 \pm 33$	1750	5000
Делагил	$544 \pm 178$	2720	1000
Гентамицин	$47200 \pm 3100$	236000	80

известной антикомплементарной активности [9] для сравнения и в известной мере проверки наших методов исследования.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве ингибиторов C1q исследовали лекарственные препараты: сульфетрон — тетранатриевая соль 4,4'-ди-(3-фенил-1,3-дисульфопропиламино)-дифенилсульфона (ОАО Химфармкомбинат “Акрихин”), мирамистин — бензилдиметил-3-(миристоиламино)-пропиламмония хлорида моногидрат (“Инфамед”, Россия), сурамин (“Bayer”, Германия), деринат — натрия дезоксирибонуклеат (ЗАО ФП “Техномедсервис”, Москва), куркумин – (E,E)-1,7-бис(4-окси-3-метокси-фенил)-1,6-гептандиен-3,5-дион (выделяли из измельченных корней *Curcuma longa* по методу А. Р. Kulkarni и соавт. [9]), лизоцим (“Брынцалов”, Россия), диклофенак натрия (“Хемофарм концерн А. Д.”, Вршац, Сербия и Черногория), слабилен — 4,4'-(2-пиколилинден)-дифенол сульфат (ООО “ЛЭНС-Фарм”, Россия), гепарин (1 мг = 120 МЕ, Фармацевтические заводы “Спофа”, Чехия), мелоксикам – 4-гидрокси-2-метил-N-(5-метил-2-тиазолил)-2Н-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид-1,1-диоксид (“Берингер Фарма”, Германия), кромогликат натрия (“Рон-Пуленк Рорер”), делагил — 4-(1-метил-4-дизтиламинобутиламино)-7-хлорхинолина дифосфат (“ICN Алкалоид”, Венгрия), гентамицина сульфат (ФГУН “НПО Микроген”, Москва).

В работе использовали 96-луночные плоскодонные микропанели (“Биомедикал”, Россия), пероксидазу хрена (НПО “Биохимреактив”, Олайне, Латвия), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ООО “Диаэм”). Субкомпонент C1q комплемента человека выделяли, как описано в [4], иммунохимически чистый IgG кролика, кроличьи антитела к C1q человека, а также конъюгаты этих антител с пероксидазой получали традиционными методами.

*Ингибирование связывания субкомпонента C1q комплемента человека.* Растворяют IgG в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрации белка 30 мкг/мл и вносят по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонной полистироловой 96-луночной микропанели. Закрывают крышкой и оставляют на ночь при 4 °С. Три раза отмывают микропанель фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05 % твин 20, затем микропанель осушают путем вытряхивания остатка жидкости. В другой микропанели с круглодонными лунками готовят свежую сыворотку крови человека (в качестве источника C1q) в разведении 1:1000 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 вносят по 50 мкл раствора изучаемого ингибитора в своей для каждой лунки концентрации, в контроле — 50 мкл буфера без ингибитора. Содержимое лунок этой микропанели переносят в первую микропанель, содержащую сорбиро-

ванный иммуноглобулин. 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 вносят 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 микропанели в каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного буфера (1,2 мг 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в 10 мл цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0, и 30 мкл 3 % перекиси водорода). После 15 мин инкубации в темноте реакцию останавливают внесением в каждую лунку 50 мкл 14 % серной кислоты. Результаты реакции учитывают с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 450 нм. Функциональную активность C1q без ингибитора и для каждой концентрации ингибитора рассчитывают сравнением оптических плотностей растворов при 450 нм. Константу ингибирования  $K_i$  определяют по линейному уравнению  $z_0/z = [I]/K_i + 1$ , где  $[I]$  — конечная концентрация ингибитора в лунках данной серии,  $z$  — в опытах в присутствии ингибитора в данной концентрации, а  $z_0$  — оптическая плотность в отсутствие ингибитора, строя график зависимости  $z_0/z$  от  $[I]$ . При этом точка пересечения графика с осью абсцисс соответствует значению  $-K_i$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработан иммуноферментный метод определения констант ингибирования связывания субкомпонента C1q с активирующими иммунными комплексами. В качестве иммунных комплексов использовали препараты иммуноглобулина G, сорбированные на микропанели. Сорбция и, тем самым, агрегация иммуноглобулинов моделировала активирующие комплемент иммунные комплексы. В качестве источника субкомпонента C1q использовали сыворотку крови человека. Количество связавшегося из сыворотки на иммуноглобулине микропанели субкомпонента C1q в отсутствие ингибитора и в присутствии различных его концентраций определяли с помощью конъюгата с пероксидазой хрена с кроличьими поликлональными моноспецифическими IgG антителами против C1q человека. График определения константы ингибирования приведен на рисунке.

Исследованию способности ингибировать классический путь активации комплемента подвергли набор лекарственных веществ, включающий нестероидные противовоспалительные препараты, средства растительного происхождения, антибиотики, дезинфицирующие, противолепрозные, противомаларийные и противопрозоидные средства. Результаты приведены в таблице. Для того, чтобы сравнить ингибирующее действие этих веществ по эффективности, в таблице

приведены максимальные терапевтические дозы этих лекарственных соединений и необходимая доза принимаемого препарата для достижения эффекта половинного ингибирования комплемента, рассчитанная из концентрации в крови, равной константе ингибирования, и общего объема крови 5 л. Конечно, такой расчет не всегда правилен. Для исследованных веществ его нельзя применять для мирамистина (препарат наружного применения) и проблематично для кромогликата натрия (ингаляционный препарат). Тем не менее можно было предполагать, что в случаях, когда необходимая доза ниже максимальной терапевтической, можно бы ожидать подавления функциональной активности комплемента на стадии его активации. Если исключить из рассмотрения уже упомянутые мирамистин и кромогликат натрия, то выпадают из потенциально активных гентамицин, мелоксикам, диклофенак и делагил. Гентамицин существенно различается по необходимой и максимальной дозам. Что касается мелоксикама, делагила и диклофенака, обладающих противовоспалительным действием, то следует отметить, во-первых, интересующие нас необходимая и максимальная дозы для диклофенака и делагила в принципе сопоставимы, во-вторых, можно предполагать, что эти соединения, как и большинство нестероидных противовоспалительных препаратов, активны на стадии блокирования образования C3/C5-конвертаза [2, 3].

Описанные в литературе константы половинного подавления гемолитической реакции для классического пути комплемента для слабилена, сульфетрона [7] и куркумина [9] практически совпадают с нашими данными по определению константы ингибирования первой стадии процесса активации комплемента.

## ВЫВОДЫ

1. Предложенный метод определения влияния лекарственных веществ на систему комплемента на первой стадии процесса активации позволяет обнаружить и оценить эффективность исследуемых веществ в их воздействии на комплемент.
2. Ряд лекарственных средств, обладающих противовоспалительной активностью, способен ингибировать активацию комплемента, что может быть компонентом механизма их противовоспалительного действия.
3. Метод целесообразно использовать для поиска препаратов, обладающих способностью ингибировать комплемент, а также для изучения побочного действия лекарственных веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Л. В. Козлов, О. О. Бурделев, С. В. Буреева, А. П. Каплун, *Биоорганическая химия*, **33**(5), 485 – 510 (2007).
2. Л. В. Козлов, В. М. Лахтин, Т. Н. Баталова и др., *Вестн. Московского университета*, Серия 2, Химия, **41**(6 прил.), 88 – 90 (2000).

3. Л. В. Козлов, В. М. Лахтин, Т. Г. Скороходова и др., *Биоорганическая химия*, **26**(11), 817 – 824 (2000).
4. Л. В. Козлов, Б. Б. Шойбонов, А. Е. Иванов и др., *Биохимия*, **54**(10), 1754 – 1760 (1989).
5. Б. П. Матвеев, Б. В. Бухаркин, *Современная онкология*, **5**(3), 114 – 118 (2003).
6. А. М. Bichucher and L. V. Kozlov, *Molecular Immunology*, **43**(1), 151 – 152 (2006).
7. S. V. Bureeva, J. E. Andia-Pravdivy, G. N. Petrov, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **13**(4), 1045 – 1052 (2005).
8. R. D. Conrow, N. Bauman, J. A. Brockman, and S. Bernstein, *J. Med. Chem.*, **23**(3), 240 – 242 (1980).
9. A. P. Kulkarni, Y. T. Ghebremariam, and G. J. Kotwal, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1056**, 100 – 112 (2005).
10. A. Roos, A. J. Nauta, D. Broers, et al., *J. Immunol.*, **167**(12), 7052 – 7059 (2001).
11. C. Saez, N. M. Thielens, E. S. Bjes, and A. F. Esser, *Biochemistry*, **38**(21), 6807 – 6816 (1999).
12. E. Sim, E. W. Gill, and R. B. Simm, *Lancet*, **25**(8400), 422 – 424 (1984).
13. N. L. Subasinghe, J. M. Travins, F. Ali, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**(8), 2200 – 2204 (2006).
14. M. Tanaka, N. Murase, Q. Ye, et al., *Transplantation*, **62**(5), 681 – 688 (1996).

Поступила 10.06.07

## EFFECT OF MEDICINAL PREPARATIONS ON THE COMPLEMENT: INHIBITION OF SUBCOMPONENT C1q BINDING TO A TARGET

A. M. Bichucher and L. V. Kozlov

Gabrichevsky Epidemiology and Microbiology Research Institute, ul. Admirala Makarova 10, Moscow, 125212 Russia

A method is developed for determining the inhibition constants of substances capable of acting on the complement system at the stage of target recognition (immune complexes) by the first component of the complement (and, hence, blocking activation of the classical pathway of the complement). The ability of some drugs to inhibit the binding of subcomponent C1q to a target has been studied. It is shown that some drugs possess a pronounced ability to block the complement activation. The inhibition constants are compared to the therapeutic doses of drugs. Some of the investigated preparations (suramin, sodium deoxyribonucleate, curcumin, heparin, sulfetron, guttalex, lysozyme) upon administration can present in the blood flow in concentrations capable of blocking the complement. The method is useful in the search for preparations capable of inhibiting the complement and in the study of side effects of medicinal preparations.