



УДК 579.234 : 57.083.3

МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА  
ИММУНОСТИМУЛЯТОРАМИ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ СТенок БАКТЕРИЙ

Козлов Л. В., Зинченко А. А., Соляков Л. С.,  
Сизой М. Н., Иценко А. М., Мартынов С. В.,  
Андреев С. В.

Институт биоорганической химии им. М. И. Шемкина  
Академии наук СССР, Москва

Исследовано влияние на систему комплемента человека препаратов клеточных стенок бактерий: липополисахаридов и полисахаридов из *E. coli*, *Salmonella typhi* (пирогенал, сальмозан), *Bact. prodigiosum* (продигиозан) и пептидогликана из *Lactobacillus bulgaricus* (бластолизин). Показано, что липополисахарид из *E. coli*, пирогенал и сальмозан эффективно связываются с первым фактором комплемента — C1q, а также определены их константы ингибирования связывания C1q с антителами и способность инициировать классический путь активации комплемента (потребление факторов C4, C2 и C3). Эти препараты слабо влияют на альтернативный путь активации комплемента. В то же время продигиозан, не влияя на классический путь активации, инициирует альтернативный путь. Определена константа связывания его с активированным фактором Bb, которая отражает константу ассоциации Bb с C3b и равна  $(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Показано, что бластолизин эффективен в отношении связывания с C1q и инициации альтернативного пути активации комплемента. Предполагается, что иммуностимулирующее действие препаратов клеточных стенок бактерий связано с активацией системы комплемента и освобождением фрагментов факторов комплемента, являющихся медиаторами иммунного ответа организма.

В последние годы значительный интерес иммунологов, медиков и фармакологов направлен на изучение и терапевтическое использование неспецифического стимулирования иммунных реакций организма, вызываемого различными препаратами клеточных стенок бактерий. Не претендуя на систематический или исчерпывающий характер обзора (в связи с обилием публикаций в отечественной и зарубежной литературе), в качестве примеров назовем лишь обзоры Соловьевой и Оводова [1], Ткаченко [2], Котани и соавт. [3] и работы экспериментального и клинического плана: Сорокиной и др. [4], Гордеевой, Дуллищевой, Туманян [5], а также цитированные в перечисленных обзорах и статьях работы. Особый интерес иммуностимуляторы вызывают в связи с их противоопухолевым эффектом [4, 6, 7].

При описании биологического действия клеточных стенок бактерий *in vivo* и *in vitro* указывается не только модуляция иммунного ответа, адьювантный эффект, стимуляция ретикулоэндотелиальной системы, увеличение проницаемости сосудов, влияние на макрофаги, лимфоциты В и Т, анафилактическое действие и т. д., но и активация системы комплемента по альтернативному и классическому путям [1–3]. Лишь в обзоре Моррисона и Райена [8], посвященном иммунному ответу, вызываемому бактериальными эндотоксинами, не уделено внимание активации комплемента, что удивительно, если учитывать вклад самого Моррисона в изучение этого вопроса [9, 10]. По-видимому, роль активации комплемента в развитии иммунного ответа пока еще не считается очевидной. Тем не менее многие из эффектов неспецифического действия клеточных стенок бактерий могут наблюдаться в результате активации комплемента. Действительно, при активации происходит освобождение фрагментов, обладающих анафилактическим действием (C2b, C4a, C3a, C5a) и увеличивающих проницаемость сосудов (см. обзор [11]). В недавней работе [12], посвященной обнаружению специфического рецептора C5a на макрофагах, сказано, что C5a должен рассматриваться не только как медиатор острого воспаления, но и как иммунопотенцирующий модулятор, определяющий связь между

активацией комплемента и последующим иммунным ответом. Многие клетки крови, в том числе макрофаги и В-лимфоциты, содержат рецепторы C3b, C3d и C4b (см. обзор [13] и цитированную в нем литературу). Инактивация фрагмента C3b приводит к его дальнейшему расщеплению и образованию фрагментов C3c, C3d, C3e, вызывающих ряд эффектов, например лейкоцитоз [11]. В связи с этим мы склонны считать, что первичным в действии клеточных стенок бактерий на макроорганизм является активация системы комплемента, а неспецифическое иммуностимулирующее действие, вызываемое клеточными стенками бактерий и препаратами на их основе, обусловлено фрагментами факторов комплемента, освобождающихся в результате каскада реакций активации.

Цель настоящего исследования — изучение активации комплемента природными иммуностимуляторами (фрагментами клеточных стенок бактерий) и установление механизма активации. Под механизмом активации мы понимаем количественные характеристики антителонезависимого связывания активаторов с инициаторами классического (фактор C1q) и альтернативного (фактор В) путей активации комплемента и изучение процесса активации, т. е. меры потребления других факторов комплемента.

Клеточные стенки бактерий покрывают клеточную мембрану и имеют сложную многослойную структуру. Внутренний слой стенки состоит из пептидогликана. Грамположительные микроорганизмы имеют наружный слой, образованный тейхоевыми кислотами, связанными с внутренним пептидогликановым слоем. У грамотрицательных бактерий наружная оболочка клеточной стенки состоит из липополисахарида. К внутреннему пептидогликановому слою примыкают низкомолекулярный гидрофобный белок и составные части липополисахарида — липид А, внутреннее ядро, наружное ядро и О-антиген. Наибольшее разнообразие проявляется в полисахаридных цепочках О-антигена различных бактерий, а также штаммов одного вида бактерий. Для пептидогликанов следует отметить небольшие различия, заключающиеся в том, что в состав пептидогликана грамположительных бактерий входит лизин, а у грамотрицательных его место занимает мезо-2,6-диаминопимелиновая кислота. Кроме того, несколько отличается строение пептидогликана из бактерий, патогенных для растений [3].

В литературе имеются некоторые, отчасти противоречивые сведения о действии различных компонентов клеточных стенок бактерий на систему комплемента. Так, относительно тейхоевых кислот в работе [14] указывается, что они являются эффективными активаторами альтернативного пути. Связываясь с C1q, они тем не менее не активируют классический путь. В другой работе [15] отмечается, что тейхоевые и липотейхоевые кислоты и белок А не влияют на альтернативный путь активации комплемента. Активация альтернативного пути клеточными стенками стафилококков обусловлена, однако, исключительно пептидогликаном. Об активации пептидогликаном преимущественно альтернативного пути говорится также в упоминавшемся уже обзоре [3]. В работе Уинкельштейна и Томаша [16], посвященной активации альтернативного пути клеточными стенками пневмококков, с другой стороны, говорится, что тейхоевые кислоты, а не пептидогликан ответственны за активацию альтернативного пути. В активирующей классический путь комплемента роли липополисахаридов основное значение, по-видимому, имеет липид А [9, 10, 17]. В одной из работ [9] также указывается, что полисахаридная часть липополисахарида может активировать альтернативный путь. Последнее утверждение не противоречит известным данным об активации альтернативного пути различными разветвленными полисахаридами (см., например, [18], а также нашу работу [19]).

В качестве объектов исследования мы выбрали в основном препараты, применяемые в клинической практике и обладающие иммуностимулирующим действием: пирогенал и сальмозан, получаемые из клеточных стенок *Salmonella typhi*, продигизан из *Bact. prodigiosum*, препарат из *Lactobacillus bulgaricus*, бластолизин, проходящий клинические испытания и представляющий собой пептидогликан или его различные фрагменты. Первые

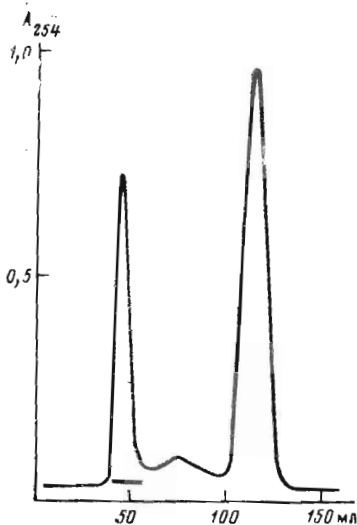


Рис. 1

Рис. 1. Гель-фильтрация через сефарозу 2В препарата липополисахарида из *E. coli*. Условия см. в «Экспер. части». Отмечена выделяемая фракция

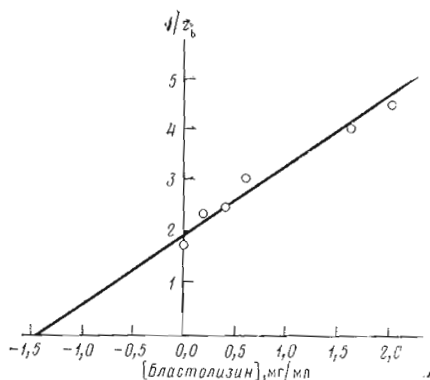


Рис. 2

Рис. 2. Определение величины  $K_1$  для связывания препарата бластолизина с С1q.  $z_1$  — число гемолитически активных молекул С1q в присутствии бластолизина

три препарата являются полисахаридами или липополисахаридами различной степени очистки. В качестве чистого липополисахарида мы использовали выделенный нами липополисахарид из *E. coli* (далее только его мы сокращенно обозначаем как ЛПС), содержащий 3% белка по Лоури, 0,18% 2-кето-3-дезокситолузоновой кислоты и характеризующийся константой седиментации  $s_{20,w}^0 = 15S$  (первый пик при разделении на сефарозе 2В (см. рис. 1)).

Было проведено сравнение этих препаратов по их способности связываться с С1q — узнающим фактором в инициации классического пути активации комплемента. Хотя запуск классического пути активации происходит при взаимодействии С1q с комплексом антиген-антитело путем специфического связывания глобулярных частей молекулы С1q с  $C_{1q}2$ -доменом иммуноглобулина, известна также антителонезависимая активация классического пути [13] и связывание компонентов клеточных стенок с С1q без последующей активации [14].

Для изучения связывания эффекторов с С1q нами был разработан способ, позволяющий следить за изменением активности С1q по конкурентному ингибированию его эффектором. Инкубацию С1q проводили в присутствии изучаемого эффектора, затем в инкубационную смесь добавляли сенсibilизированные эритроциты барана (ЕА). Те молекулы С1q, которые содержали связанный эффектор, не могли связываться и активироваться антителами на эритроцитах. Чтобы предотвратить действие ингибитора на последующие стадии каскада активации комплемента и связывание на ЕА фактора С1q, освобождающегося из обратимого комплекса с ингибитором при разбавлении реакционной смеси реагентом, образовавшийся со свободным С1q комплекс ЕАС1q отделяли от реакционной смеси, содержащей несвязавшийся С1q и ингибитор. Количество комплекса ЕАС1q оценивали по гемолизу эритроцитов при добавлении реагента R1q, представляющего собой лишенную С1q полную систему комплемента. Для получения R1q сыворотку крови пропускали через колонку с аффинным сорбентом С1q — иммуноглобулинсефарозой. Отличие полученного нами сорбента от описанных в литературе (см., например, [20]) состоит в том, что иммуноглобулины присоединяли к матрице через пространственную группу, что обеспечивало получение высококачественного R1q за счет более полного связывания С1q. Степень гемолиза ( $y$ ) даст информацию о числе гемоли-

**Константы ингибирования и активация альтернативного пути препаратами клеточных стенок бактерий**

Препарат	Источник	Химическая природа	Связывание с С1q, $K_1$ , мкг/мл	Активация альтернативного пути	
				концентрация, мкг/мл	снижение активности, %
ЛПС	<i>E. coli</i>	Липополисахарид	103±21	333,3	11,6
Пирогенал	<i>S. typhi</i>	»	11,0±1,4	16,7	0
Сальмозан	<i>S. typhi</i>	Полисахарид	57,6±8,8	50,0	0
				100,0	23,3
				200,0	48,7
Продигиозан	<i>B. prodigiosum</i>	»	Не ингибирует (в концентрации 1 мг/мл)	1,7	50,0
Бластолизин	<i>L. bulgaricus</i>	Пептидогликан	1500±230	3 300	18,6
				6 700	41,9
				13 300	60,5

тически эффективных молекул С1q, точнее, о доле гемолитически эффективных молекул —  $z$ . Для расчета  $z$  пользуются формулой  $z = -\ln(1-y)$ . Практически величина  $z$  определяется по формуле  $z = \ln(K_L - K_R) / (K_L - A)$ , где  $K_L$ ,  $K_R$  и  $A$  — величины  $A_{12}$  соответственно в контроле на полный лизис эритроцитов, в контроле на реагент и в опыте [21]. Было показано, что определяемая таким способом величина  $z$  линейно связана с концентрацией активных молекул С1q. В присутствии различных концентраций ингибитора [I] получали различные значения  $z_i$  ( $z_0$  — в отсутствие ингибитора). Легко показать, что в случае конкурентного связывания ингибитора с С1q активность последнего, выражаемая величинами  $z_0$  и  $z_i$ , зависит от [I] согласно уравнению

$$\frac{1}{z_i} = \frac{[I]}{z_0} \frac{1}{K_1} + \frac{1}{z_0}$$

Из зависимости  $1/z_i$  от [I] получаем в точке пересечения прямой с осью абсцисс значение, равное  $-K_1$  (рис. 2).

Многочисленными экспериментами было установлено, что С1q в используемой в опыте концентрации быстро инактивируется. Для сохранения его активности в качестве исходного раствора использовали сыворотку крови в количестве 0,1 мл на пробу. В условиях эксперимента С1q не успевал денатурировать, а изначально присутствующий в сыворотке суммарный С1 в реакционной смеси диссоциировал на 95% до С1q ( $K_{acc} = 4,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  [22]) (в сыворотке он диссоциирован лишь на 10%). Для проверки адекватности нашего метода была определена константа связывания сурамина с С1q. Было найдено, что  $K_1 = (3,7 \pm 1,3) \cdot 10^{-5} \text{ M}$ , что согласуется с литературными данными ( $\sim 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  [23]).

Для исследования влияния на альтернативный путь активации комплемента проводили инкубацию препаратов с сывороткой крови в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$  и EGTA (т. е. в бескальциевой среде для предотвращения запуска классического пути активации) и определяли уменьшение активности комплемента по альтернативному пути через 20 мин инкубации при 37° С [24]. Снижение активности по альтернативному пути активации обусловлено главным образом связыванием и активацией фактора В [19].

Результаты определения связывания препаратами факторов С1q и В приведены в таблице. Полученные данные вносят определенный вклад в наши знания об активации комплемента фрагментами клеточных стенок бактерий. Так, в отличие от сложившихся представлений об активации пептидогликанами преимущественно альтернативного пути [3, 15] результаты экспериментов с бластолизином свидетельствуют о влиянии этого препарата на оба пути активации и, по-видимому, преимущественном воздействии на классический путь. Полисахарид продигиозан активирует исключительно альтернативный путь, что согласуется с известными пред-

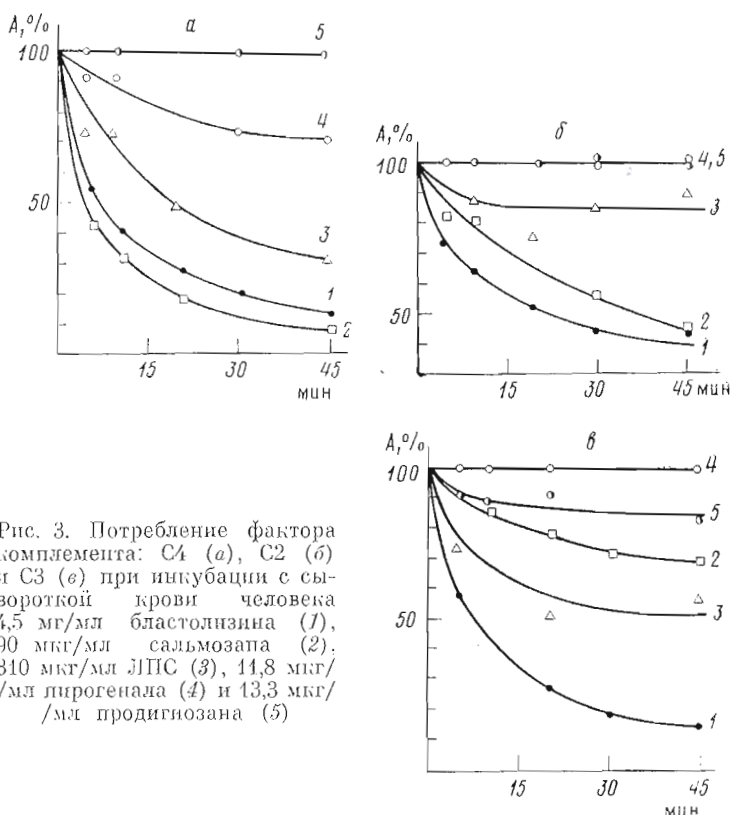


Рис. 3. Потребление фактора комплемента: С4 (а), С2 (б) и С3 (в) при инкубации с сывороткой крови человека 4,5 мг/мл бластолизина (1), 90 мг/мл сальмозана (2), 310 мкг/мл ЛПС (3), 11,8 мг/мл пирогенана (4) и 13,3 мкг/мл продигиозана (5)

ставлениями [9, 18, 19]. Однако другой полисахарид — сальмозан — наряду со слабым влиянием на альтернативный путь эффективно активирует классический путь. Активация классического пути чистыми полисахаридами в литературе не описана. Как уже упоминалось, считается, что за активацию классического пути комплемента липополисахаридами ответствен исключительно липид А [9, 10, 17]. Действительно, мы обнаружили, что липополисахариды из *E. coli* и *S. typhi* (пирогенал) связывают С1q. Однако полисахарид из того же микроорганизма, освобожденный от липида А, — сальмозан — также эффективно связывается с С1q. С другой стороны, липополисахариды не были хорошими активаторами альтернативного пути.

Связывания с С1q часто бывает недостаточно для активации первого и последующих факторов комплемента. Активация первого фактора комплемента приводит к появлению фермента С1s, субстратами которого являются С4 и С2. Их активация при благоприятных условиях (когда С4b может связываться с подходящей поверхностью) вызывает образование комплексного фермента — С3-конвертазы, представляющего магний-зависимый комплекс С4b2a<sub>3</sub>. Субстратом этого нового фермента является С3, активация которого с последующим связыванием С3b превращает С3-конвертазу в С5-конвертазу. Таким образом, активация первого фактора комплемента каким-либо фактором может приводить, а может и не приводить к активации и потреблению последующих факторов каскада реакции системы комплемента. Для изучения потребления факторов комплемента при активации его препаратами из клеточной стенки бактерий мы инкубировали при 37° С сыворотку крови с препаратами в концентрациях, по возможности в 2–3 раза превышающих величины К<sub>1</sub>, для того чтобы результаты можно было сопоставлять. Следили за кинетикой снижения активностей факторов С4, С2 и С3 (рис. 3). Инкубацию проводили в присутствии Са<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, за исключением опытов по потреблению С3 при инкубации с продигиозаном, когда эксперименты осуществляли в системе Mg<sup>2+</sup> — EGTA для активации альтернативного пути. На рис. 3 показаны результаты уменьшения активностей факторов в присутствии препаратов.

Данные по потреблению С4 свидетельствуют о почти равной эффективности всех препаратов, за исключением пирогенала. Наибольшей эффективностью обладает сальмозан. Обнаружить активацию С2 и С3 под действием пирогенала не удалось. Такой активации могут мешать либо белки и липиды, присутствующие в этом недостаточно очищенном препарате, либо характер микроповерхности, формируемой липополисахаридом. Данные по потреблению С2 показывают, что на этом этапе каскада активации комплемента наиболее эффективен бластолизин, а сальмозан действует несколько слабее. Еще менее эффективен сальмозан в потреблении С3, где бластолизин по-прежнему наиболее активен. Эти результаты свидетельствуют о том, что характер активации факторов комплемента различными эффекторами может различаться. Наибольшая эффективность бластолизина может объясняться также и тем, что он одновременно активирует оба пути активации комплемента: классический и альтернативный. Возможность потребления факторов С4 и С2 при активации альтернативного пути рассматривалась нами ранее [19].

Следует отметить, что активатор альтернативного пути — продигиозан — был довольно мало эффективен в отношении потребления фактора С3. Поэтому возникло сомнение относительно его влияния на альтернативную систему. Можно было, например, предположить, что продигиозан является неспецифическим ингибитором фактора В. Мы проверили его влияние на очищенный фактор В в присутствии очищенного фактора D. Оказалось, что активность фактора В в этом случае не изменялась, а активность фактора В при инкубации сыворотки крови с продигиозаном снижалась. Следовательно, для действия продигиозана необходимо участие также фактора С3. В связи с этим мы провели титрование продигиозана фактором В сыворотки крови с использованием для расчета метода Скэтчарда. При одной концентрации продигиозана инкубировали разные количества сыворотки и после инкубации методами, описанными ранее [24, 25], определяли количество оставшегося активного фактора В. Опыт позволил оценить константу ассоциации, равную  $(2,40 \pm 0,13) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , а также тот факт, что 2,5 мкг продигиозана связывают  $16,14 \pm 0,21$  мкг фактора В. Последняя величина означает, что молекулярный вес звена в продигиозане, связывающего одну молекулу фактора В, равен  $14\,400 \pm 200$ .

При активации альтернативного пути системы комплемента на иницирующей поверхности происходит ковалентное связывание фактора С3 в виде его фрагмента С3b, ацилирующего ОН-группу поверхности. С3b связывает в обратимый магний-зависимый комплекс фактор В. Константа ассоциации такого комплекса равна  $(6,5 \pm 0,5) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  [26]. Этот комплекс становится более прочным при связывании пропердина ( $K_{\text{acc}} = (4,3 \pm 0,5) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  [26]). Известно, что после активации в этом комплексе фактора В фактором D и превращения В в активированный Вb, комплекс становится еще более прочным, однако константа ассоциации такого комплекса определена не была. Этот комплекс, являющийся С3-конвертазой, необратим, т. е. после диссоциации из него фрагмента фактора В — Вb последний теряет свою функциональную активность. В наших опытах по титрованию продигиозана сывороткой крови мы воспользовались этим обстоятельством для определения концентрации образующейся С3-конвертазы — разбавление, необходимое для определения свободного фактора В по его гемолитической активности, не увеличивало количества свободного активного фактора В за счет диссоциации С3-конвертазы. Определенная нами константа ассоциации соответствует комплексу С3bВb, вероятно упроченному также связыванием пропердина. Полученная величина в 5 раз выше, чем для обратимого комплекса, что количественно доказывает его большую прочность.

Возвращаясь к полученным нами данным об активации системы комплемента иммуностимуляторами из клеточных стенок бактерий, следует отметить, что освобождение фрагментов факторов комплемента при такой активации может быть причиной иммунной стимуляции организма.

## Экспериментальная часть

В работе использовали 5,5-диэтилбарбитуровую кислоту и ее натриевую соль (Serva, ФРГ), этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусную кислоту (EGTA; Sigma, США), сефарозу 2В и 4В (Pharmacia, Швеция), сывороточный альбумин человека (Reanal, Венгрия), дигидразид адипиновой кислоты (Merck, ФРГ), гексанатриевую соль симм-бис(амино-*n*-метилбензоил-1-нафтиламино-4,6,8-трисульфонат)карбамид (антрипол, сурамин, германин, Байер-205; Bayer, ФРГ), сальмозан — лекарственный препарат (лаборатория естественного иммунитета Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР), пирогенал и продигозан — лекарственные препараты отечественного производства, остальные реактивы (квалификации не ниже ч.д.а.) отечественного производства.

*Изотонический буферный раствор с  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  ( $VBS^{2+}$ )* готовили как описано в работе [21].

*VBS, содержащий  $Mg^{2+}$  и EGTA ( $VBS-Mg-EGTA$ )* готовили согласно методике [24].

*Изотонический буферный раствор с сахарозой и альбумином, pH 7,4 ( $VBSSA^{2+}$ )* готовили, смешивая равные объемы  $VBS^{2+}$  и 9% раствор сахарозы, содержащий сывороточный альбумин человека (1 мг/мл), 0,5 мМ  $MgCl_2$  и 0,15 мМ  $CaCl_2$ .

*Изотонический трис-буфер с  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , pH 7,4 ( $TBS^{2+}$ )* содержал 0,5 мМ трис-НCl, 0,15 мМ NaCl, 0,5 мМ  $MgCl_2$  и 0,15 мМ  $CaCl_2$ .

*Определение активностей факторов В и D* проводили в соответствии с работами [24, 25].

*Определение активностей факторов C2, C3 и C4* проводили как описано в работе [21].

*Получение эритроцитов барана и сенсibilизированных эритроцитов (ЕА)* описано в работе [21], эритроцитов кролика — в работе [24].

*Липополисахарид из E. coli (ЛПС)* выделяли по модифицированному методу Моррисона и Лейва [27] из клеток *E. coli* штамма М 17. Клетки собирали на стационарной фазе роста, промывали дважды 0,15 М NaCl с центрифугированием и суспендировали в 0,15 М NaCl до концентрации 30 г влажного веса клеток на 100 мл. Все операции по экстракции ЛПС проводили при 4°С. К суспензии клеток добавляли равный объем насыщенного водного раствора *n*-бутанола, смесь механически встряхивали 15–20 мин и центрифугировали 40 мин со скоростью 6000 об/мин (ротор JS 7,5, центрифуга J2-21; Beckman, Австрия). Нижнюю фазу, содержащую ЛПС, отбирали шприцем, промежуточную фазу удаляли, а верхнюю бутанольную фракцию и осадок подвергали повторной экстракции 0,5 от исходного объема 0,15 М NaCl. Водные фазы объединяли, центрифугировали и к раствору добавляли трис-НCl-буфер, pH 7,5, до конечной концентрации 10 мМ. Раствор подвергали ферментативной обработке ДНКазой, затем РНКазой (по 5–10 мкг/мл, 6 ч, 37°С), проназой (20 мкг/мл, 12 ч, 37°С), центрифугировали 20 мин при 20 000 g и ЛПС осаждали 50% этанолом. Осадок растворяли в том же буфере и подвергали гель-фильтрации на колонке (2,6×100 см) с сефарозой 2В со скоростью 29 мл/ч (рис. 1). Препарат разделялся на три пика. Собирали фракцию первого пика (объем элюирования совпадал с объемом выхода голубого декстрана), диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Препарат содержал 3% белка (по Лоури) и 0,18% 2-кето-3-дезоксиктулозоновой кислоты [28]. Константа седиментации  $s_{20,w} = 15S$ .

*Получение реагента R1q.* Реагент получали методом аффинной хроматографии на IgG-сефарозе. Иммуноглобулины (IgG) получали осаждением из сыворотки крови при помощи  $(NH_4)_2SO_4$  (фракция 0–40% от полного насыщения) с последующей фильтрацией раствора в 0,2 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,15 М NaCl, через DEAE-целлюлозу (DE-52; Whatman, Англия). 400 мл отмытой сефарозы 4В перемешивали с 20 мл раствора  $BuCN$  в ацетонитриле (1 г/мл), поддерживая pH 11,0±0,2 добавлением 4 М NaOH. Через 1 ч реакционную смесь охлаждали, отмы-

вали холодным 0,1 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,5. Активированную сефарозу суспендировали в 400 мл 0,1 М дигидразида адипиновой кислоты в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,5, и перемешивали при помощи механической мешалки 18 ч при 4° С. Полученный сорбент отмывали от избытка дигидразида дистиллированной водой и суспендировали в 300 мл 50% уксусной кислоты, содержащей 1,5% HCl, при -5° С, добавляли 3,6 г NaNO<sub>2</sub>, растворенного в 10 мл дистиллированной воды, и перемешивали 15 мин. Суспензию отмывали холодной дистиллированной водой и немедленно суспендировали в 380 мл раствора IgG (12 мг/мл) в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,5, и перемешивали 18 ч при помощи механической мешалки при 4° С. Избыток IgG отмывали тем же буфером и белок определяли методом Лоури. С сорбентом связывалось 98% исходного IgG. Для получения R1q через колонку (5×30 см) с 300 мл IgG-сефарозы пропускали 900 мл сыворотки крови человека, содержащей 10 мМ EDTA, со скоростью 90 мл/ч. В этих условиях C1q сорбируется на IgG-сефарозе, а фильтрат представляет собой реагент, не содержащий C1q, т. е. R1q. На 1 мл R1q добавляли 20 мкл раствора, содержащего 0,3 М CaCl<sub>2</sub> и 1 М MgCl<sub>2</sub>. R1q лиофильно высушивали.

*Ингибирование C1q.* 100 мкл раствора обратимого ингибитора в подобранном диапазоне концентраций в TBS<sup>2+</sup> и 0,12 мкл свежей сыворотки крови человека инкубировали 15 мин при 4° С. Добавляли 20 мкл суспензии EA (1,5·10<sup>8</sup> клеток/мл) в VBS<sup>2+</sup> и инкубировали 15 мин при 30° С. Реакцию останавливали, охлаждая пробы в ледяной воде, центрифугировали 10 мин при 1500g с охлаждением. К осадку EAC1q добавляли 0,5 мл раствора реагента (10 мг/мл) в VBSSA<sup>2+</sup> и тщательно перемешивали встряхиванием. Суспензию инкубировали 60 мин при 37° С. Добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали 10 мин при 1500g и измеряли A<sub>412</sub>. Измеренная величина (степень лизиса  $y$ ), а также ее величины для полного лизиса эритроцитов и степени лизиса в контроле без C1q использовали для расчета величины  $z$ .

*Определение потребления в сыворотке факторов C2, C4 и C3.* 20 мкл сыворотки крови человека и 60 мкл раствора эффектора в VBS<sup>2+</sup> (для бластотлизина, пирогенала и ЛПС), в TBS<sup>2+</sup> (для сальмозана) или в VBS-Mg-EGTA (для продигиозана) инкубировали при 37° С, отбирая пробы во времени для определения гемолитической активности факторов C2, C4 и C3 [21].

*Определение активации альтернативного пути.* 100 мкл раствора препарата в VBS-Mg-EGTA и 200 мкл сыворотки крови человека, разбавленной (1:7) VBS-Mg-EGTA, инкубировали 20 мин при 37° С, затем добавляли 200 мкл суспензии эритроцитов кролика [24] и инкубировали 30 мин при 37° С. Смесь охлаждали до 4° С, добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали 10 мин при 1500g и определяли A<sub>412</sub> — степень лизиса по альтернативному пути [24].

*Влияние продигиозана на очищенный фактор В.* 100 мкл раствора продигиозана (50 мкг/мл), 200 мкл раствора фактора В (200 мкг/мл) и 10 мкл раствора фактора D (50 мкг/мл), приготовленных на VBS-Mg-EGTA, инкубировали 20 мин при 37° С. Активности фактора В в опыте и в контроле (без продигиозана) были одинаковыми. Очищенные факторы В и D получали как описано в работе [25].

*Титрование продигиозана сывороткой с расчетом по методу Скэтчарда.* Инкубировали 1,7 мл сыворотки крови человека 20 мин при комнатной температуре с 0,2 мл 0,1 М EGTA, рН 7,4, и 0,1 мл 0,1 М MgCl<sub>2</sub>. Различные количества такого раствора, содержащего сыворотку (от 100 до 250 мкл), инкубировали с 50 мкл раствора продигиозана в VBS-Mg-EGTA и VBS-Mg-EGTA (до конечного объема 300 мкл). В пробах определяли остаточную активность фактора В и рассчитывали количества свободного и связанного фактора В. Для количеств исходного фактора В, равных 30,2; 24,2; 18,3; 12,8 мкг, получали количества свободного фактора, соответственно равные 15,1; 9,7; 5,2 и 2,2 мкг. Полученные данные использованы для построения графика Скэтчарда и определения K<sub>асс</sub> и молекулярного веса звена продигиозана, ответственного за связывание 1 молекулы фактора В.



ЛИТЕРАТУРА

1. Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Усп. соврем. биол., 1980, т. 90, № 1, с. 62-79.
2. Ткаченко В. В. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1982, № 9, с. 20-28.
3. Kotani S., Takada H., Tsujimoto M., Ogawa T., Kato K., Okunaga T., Ishihara Y., Kawasaki A., Morisaki I., Kono N., Shimonoto T., Shiba T., Kusumoto S., Inage M., Harada K., Kitaura T., Kano S., Inai S., Nagaki K., Matsumoto M., Kubo T., Kato M., Tada Z., Yokogawa K., Kawata S., Inoue A. In: Immunomodulation by Bacteria and Their Products/Eds Frieman H., Klein T. W., Szentivanyi A. N. Y.: Plenum Press, 1981, p. 231-273.
4. Сорокина П. Б., Хасман Э. Л., Горькова Н. П., Учитель И. Я. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1980, т. 89, № 4, с. 449-452.
5. Гордеева М. С., Дуплищева А. П., Туманян М. А. Иммунология, 1981, № 3, с. 27-30.
6. Bogdanov P. G., Dalev P. G., Gurevich A. I., Kolosov M. N., Mal'kova V. P., Pletyanikova L. A., Sorokina I. B. FEBS Lett., 1975, v. 57, № 3, p. 259-261.
7. Богданов П. Г., Величков В. Т., Гуревич А. П., Далев П. Г., Колосов М. Н., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Христова Л. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1977, т. 84, № 12, с. 709-712.
8. Morrison D. C., Ryan J. L. In: Adv. Immunol./Eds Dixon F. J., Kunkel H. G. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 28, p. 293-450.
9. Morrison D. C., Kline L. F. J. Immunol., 1977, v. 118, № 1, p. 362-368.
10. Cooper N. R., Morrison D. C. J. Immunol., 1978, v. 120, № 6, p. 1862-1868.
11. Müller-Eberhard H. J. In: Molecular Basis of Biological Degradative Processes /Eds Berlin R. D., Hermann H., Lepow I. H., Tanzer J. M. N. Y.: Acad. Press, 1978, p. 65-114.
12. Chenoweth D. E., Goodman M. G., Weigle W. O. J. Exp. Med., 1982, v. 156, № 1, p. 68-78.
13. Reid K. B. M. In: Comprehensive Biochemistry /Eds Florin M., Neuberger A., Van Deenen L. L. M. Elsevier, 1980, v. 19B, part 1, p. 461-518.
14. Prellner K. Acta pathol. et microbiol. scand. Sect. C, 1981, v. 89, № 6, p. 359-364.
15. Verbrugh H. A., Van Dijk W. C., Peters R., Van Erne M. E., Daha M. R., Peterson P. K., Verhoef J. J. Immunol., 1980, v. 124, № 3, p. 1167-1173.
16. Winkelstein J., Tomasz A. J. Immunol., 1978, v. 120, № 1, p. 174-178.
17. Loos M., Bitter-Suermann D., Dierich M. J. Immunol., 1974, v. 112, № 3, p. 935-940.
18. Inai S., Nagaki K., Ebisu S., Kato K., Kotani S., Misaki A. J. Immunol., 1976, v. 117, № 4, p. 1256-1260.
19. Козлов Л. В., Чух В. П., Соляков Л. С. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 817-821.
20. Kolb W. P., Kolb L. M., Podack E. R. J. Immunol., 1979, v. 122, № 5, p. 2103-2111.
21. Козлов Л. В., Крылова Ю. П., Чух В. П., Молчанова Н. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 652-659.
22. Ziccardi R. J., Tschopp J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 107, № 2, p. 618-623.
23. Lin T.-Y., Fletcher D. S. Immunochimistry, 1978, v. 15, № 2, p. 107-117.
24. Козлов Л. В., Соляков Л. С. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 3, с. 342-348.
25. Соляков Л. С., Козлов Л. В. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 462-469.
26. DiScipio R. G. Biochem. J., 1981, v. 199, № 2, p. 485-496.
27. Morrison D. C., Leive L. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 8, p. 2911-2919.
28. Karkhanis J. D., Zellner J. X., Jackson J. J., Caslo D. J. Analyt. Biochem., 1978, v. 85, № 2, p. 595-601.

Поступила в редакцию 18.I.1983

MECHANISM OF HUMAN COMPLEMENT ACTIVATION BY IMMUNOSTIMULATORS FROM BACTERIAL CELL WALLS

KOZLOV L. V., ZINCHENKO A. A., SOLYAKOV L. S., SIZOJ M. N.,  
ISHCHENKO A. M., MARTYUSHIN S. V., ANDREEV S. V.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow

Effects on the human complement system of the cell wall preparations: lipopolysaccharides and polysaccharides of *E. coli*, *Salmonella typhi* (pyrogenal, salmosan), *Bact. prodigiosum* (prodigiosan) and peptidoglycan of *Lactobacillus bulgaricus* (blastolysin) have been studied. Lipopolysaccharide of *E. coli*, pyrogenal and salmosan were found to bind efficiently the first complement factor C1q. The constants for inhibition of the C1q binding to antibodies by the mentioned preparations were determined, and their ability to initiate the classical pathway of complement activation (consumption of C4, C2 and C3 factors) was assayed. These preparations only slightly affect the alternative pathway. Prodigiosan, not influencing the classical pathway, initiates the alternative one. Its binding constant with the activated  $\bar{B}\bar{b}$  factor was determined. This constant reflects the  $\bar{B}\bar{b}$  association with C3b and is  $(2.4 \pm 0.1) \cdot 10^7$  mole<sup>-1</sup>. Blastolysin is effective both in the C1q binding and initiation of the alternative pathway of complement activation. Immunostimulating activity of the bacterial cell wall preparations seems to involve activation of the complement system and the release of the fragments from the complement factors which are mediators of the immune response.