

ПРОФИЛЬ ГИДРОЛИЗА C3 КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА – БИОХИМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ОНКОПАТОЛОГИИ?

Князева О.А., Киреева Е.А.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа,
e-mail: olga_knyazeva@list.ru

Цель исследования – изучение профиля спонтанного гидролиза C3 компонента комплемента при переходе в конформационную форму C3(H₂O) в процессе инкубации сыворотки и плазмы крови при онкопатологии. Уровень C3 и C3(H₂O) определяли в процессе инкубации при 37°C сыворотки и плазмы крови онкобольных с помощью специфических моноклональных антител. Показано, что доля C3(H₂O) от C3 у больных с ходжкинскими (ХЛ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) в отличие от здоровых доноров на протяжении 24 часов изменяется различным образом. В сыворотке ХЛ статистически значимые отличия наблюдались через 5, 7 (при ХЛ выше, чем в контроле), 9, 11 и 24 часа инкубации (в контроле выше, чем при ХЛ). У больных НХЛ данный показатель превышал контроль так же, как и при ХЛ, через 5 и 7 часов. В плазме крови значительное увеличение показателя C3(H₂O)/C3 наблюдалось через 9 часов инкубации. Подобные изменения C3 в сыворотке крови выявлены в эксперименте на мышах BALB/c с привитой миеломой. После двухнедельной терапии животных комплексом из синтезированных соединений 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn) (II) с глюконовой кислотой, происходила коррекция профиля гидролиза C3. Предполагается, что различия по профилю гидролиза C3 у онкобольных и здоровых лиц связаны с его посттрансляционной модификацией под действием возрастания нуклеофилов и протеолитических ферментов при онкопатологии, что может быть использовано в качестве дополнительного биохимического маркера для диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: C3 компонент комплемента, профиль гидролиза C3, C3(H₂O), плазма, сыворотка крови, онкопатология

PROFILE OF THE HYDROLYSIS OF THE C3 COMPONENT OF COMPLEMENT IS A BIOCHEMICAL MARKER OF CANCER?

Knyazeva O.A., Kireeva E.A.

Bashkir State Medical University, Ufa, e-mail: olga_knyazeva@list.ru

The purpose of this study was to profile the spontaneous hydrolysis of C3 component of complement in the conformational transition to form C3(H₂O) in the process of incubation of the serum and plasma of blood in oncopathology. The level of C3 and C3(H₂O) was determined during incubation at 37°C serum and blood plasma of cancer patients using specific monoclonal antibodies. It is shown that the proportion of C3(H₂O)/C3 from patients with hodgkinsine (CL) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) in contrast to healthy donors for 24 hours change in different ways. Serum CL, statistically significant differences were observed at 5, 7 (with CL higher than in control), 9, 11 and 24 hours of incubation (control higher than in CL). In patients with NHL, this figure was higher than the control as well as in the CL, after 5 and 7 hours. In blood plasma a significant increase in C3(H₂O)/C3 was observed after 9 hours incubation. Such changes of C3 in the serum were revealed in experiments on mice BALB/c grafted myeloma. After two weeks of therapy animals by a set of synthesized compounds 3d metals (Mn, Fe, Co, Cu and Zn) (II) with gluconic acid, there is a correction profile of the hydrolysis of C3. It is assumed that differences on the profile of the hydrolysis of C3 in cancer patients and healthy individuals are associated with its posttranslational modification under the action of increasing nucleophilic and proteolytic enzymes for cancer pathology that can be used as an additional biochemical marker for the diagnosis of cancer.

Keywords: C3 component of complement, C3(H₂O), incubation, plasma and serum of cancer patients, the profile of the hydrolysis of C3

Ограниченный протеолиз белков является одним из важнейших средств регулирования деятельности организма, поэтому его изучение необходимо для понимания механизмов модификации белка при патологии [1]. При этом особый интерес представляют не денатурационные процессы, а тонкие конформационные переходы. Удобной моделью для таких исследований является спонтанный гидролиз C3 компонента комплемента [2].

Среди белков системы комплемента компонент C3 – наиболее универсальная и многофункциональная молекула. Одной

из значимых его особенностей является способность ковалентно присоединяться к акцепторным молекулам на поверхности клетки через эфирную или амидную связи [3, 4]. Это свойство C3 проясляет благодаря наличию внутримолекулярной тиоэфирной связи в α-цепи. Тиоэфирная связь формируется в течение посттрансляционной модификации между тиольной группой цистеина и аминогруппой глутамина в пределах последовательности Gly-Cys⁹⁸⁸-Gly-Glu-Gln⁹⁹¹-Asn [5]. В результате происходит перестройка молекулы и образуется ее конформационная форма C3(H₂O), формирую-

щая начальную конвертазу альтернативного пути активации комплемента вместе с фактором В, который, как было показано, проявляет более высокое сродство к С3(H₂O) чем к С3b [6].

С3 компонент активируется как путем конвертазно-зависимого расщепления, так и путем его конформационного перехода в С3(H₂O). Спонтанный гидролиз тиоэфирной связи нативного С3 происходит постоянно, в нормальной сыворотке крови количество С3(H₂O) колеблется от 0,3 до 2,5% от общего уровня С3 [2].

Ходжкинские лимфомы (ХЛ) – злокачественное заболевание лимфатической системы, обычно проявляющееся в виде лимфоаденопатий различных локализаций, при котором немногочисленные диффузно рассеянные атипичные клетки имеют В-клеточную природу.

Неходжкинские лимфомы (НХЛ) – группа опухолей из клона лимфоидных клеток, являющихся предшественниками различной гистогенетической принадлежности и степени дифференцировки [7].

Целью данного исследования явилось изучение профиля спонтанного гидролиза С3 компонента комплемента при переходе в конформационную форму С3(H₂O) в процессе инкубации сыворотки и плазмы крови при онкопатологии.

Материалы и методы исследования

Определение уровня С3 компонента системы комплемента и его конформационной формы – С3(H₂O) проводили в процессе инкубации сыворотки и плазмы венозной крови 14 больных ХЛ и 16 НХЛ в сравнении с контрольной группой из 12 здоровых доноров. Кровь брали в две пробирки: 1 – без ЭДТА, 2 – с 0,1 М ЭДТА (рН 7,4) в соотношении 4:1 (добавление ЭДТА, хелатирующего катионы, блокирует переход фибриногена в нерастворимый фибрин, а также переводит ферменты в формы, не способные проявлять свою активность, в том числе системы комплемента). Затем сыворотку и плазму отделяли центрифугированием при 300 g, инкубировали при 37 °С в течение 1,5; 3; 5; 7; 9; 11; 24 часов, замораживали и хранили при 70 °С. Размораживание проб проводили одновременно, непосредственно перед постановкой эксперимента. Уровень С3 и С3(H₂O) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью специфических моноклональных антител (МКА) [ГНЦ НИИ ОЧБ, Санкт-Петербург].

Для экспериментального исследования на животных были использованы линейные мыши BALB/c (34 самца массой 22–25 г), у которых моделировали рак путем внутрибрюшинного инъецирования клеток мышинной миеомы Sp 2/0 Ag14 (0,5×10⁶ кл/мышь). Животным опытной группы в течение двух недель перорально вводили комплекс синтезированных соединений 3d-металлов (II): Mn, Fe, Co, Cu и Zn с глюконовой кислотой (0,4 мг/мл, суточная доза – 4 мг/кг) [2]. Состав глюконатов отвечал фор-

муле Me(C₆H₁₁O₇)₂·2H₂O, где Me – атом металла. На 16-е сутки у животных забирали кровь из хвостовой вены и отделяли путем центрифугирования сыворотку, в которой аналогичным образом определяли С3 и С3(H₂O). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Microsoft Excel».

Результаты исследования и их обсуждение

Из представленных в табл. 1–2 данных видно, что концентрации С3 компонента и его конформационной формы С3(H₂O) при ХЛ и НХЛ через 1,5 часа после забора крови оставались на уровне здоровых доноров. Однако в процессе инкубации сыворотки и плазмы их уровень менялся, значимо отличаясь от контрольного. Так, концентрация С3 компонента в сыворотке крови (табл. 1) больных ХЛ на протяжении всех точек измерения была выше, чем в контроле: через 3, 5, 11, 24 часа (p < 0,001), через 7 и 9 часов (p < 0,01). В сыворотке крови больных НХЛ уровень С3 оставался также выше за исключением 7 часов. В плазме (табл. 2) у больных ХЛ уровень С3 также превышал контрольный. При НХЛ в отличие от ХЛ через 9 часов наблюдалось резкое снижение С3 по сравнению с контролем (p < 0,01).

Концентрация С3(H₂O) в сыворотке крови больных ХЛ в процессе инкубации изменялась по сравнению с контрольными пробами неоднократно: через 3, 5 и 7 часов уровень С3(H₂O) превышал (p < 0,001), а через 24 часа – наоборот, становился ниже контрольного уровня (p < 0,001). У больных НХЛ уровень С3(H₂O) в сыворотке крови в первые 7 часов инкубации почти не менялся, оставаясь в пределах от 10,07 ± 0,65 мкг/л до 9,92 ± 0,57 мкг/л, превышая контроль через 3, 5 и 7 часов (p < 0,001). При этом его содержание в сыворотке крови здоровых лиц существенно снижалось уже к 3 часу наблюдений. К 24 часам инкубации уровень С3(H₂O) в сыворотке крови, как доноров, так и больных НХЛ резко снижался.

В плазме крови (табл. 2) результаты были более стабильными: при ХЛ уровень С3(H₂O) на протяжении всего времени наблюдений оставался выше контрольного. При НХЛ через 1,5 и 3 часа инкубации концентрация С3(H₂O) не отличалась от контроля, снижаясь к 3 часу. Но уже к 5 часу уровень С3(H₂O) при НХЛ становился выше, чем в контроле примерно в 2,5 раза (p < 0,001), затем к 7 часам снижался и к 9 часам вновь поднимался, превышая контроль в 2,5 раза (p < 0,001). Через 11 и 24 часа инкубации уровень С3(H₂O) падал почти в 2 раза, при этом также оставаясь выше, чем в контроле (p < 0,001).

Таблица 1
Уровень С3 и С3(Н₂О) при инкубации сыворотки крови больных ходжкинскими (ХЛ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) в сравнении со здоровыми донорами (контроль)

Время инкубации сыворотки, час	С3, мкг/мл						С3(Н ₂ О), мкг/мл							
	1,5	3	5	7	9	11	24	1,5	3	5	7	9	11	24
Здоровые (n = 12)	1303 ± 44,2	1052 ± 40,3	725 ± 42	1297 ± 62	998 ± 41,8	1148 ± 72,3	748 ± 43	10,09 ± 0,68	6,02 ± 0,25	4,31 ± 0,32	5,92 ± 0,34	6,32 ± 0,31	5,48 ± 0,3	1,3 ± 0,07
Больные ХЛ (n = 14)	1448 ± 77,5	1640 ± 85**	1225 ± 74,2**	1746 ± 107*	1450 ± 103*	2020 ± 118**	1198 ± 64,5**	9,92 ± 0,66	9,95 ± 0,67**	9,98 ± 0,56**	9,93 ± 0,47**	5,94 ± 0,43	6,05 ± 0,34	0,62 ± 0,03**
Больные НХЛ (n = 16)	1447 ± 95,8	2080 ± 139**	1225 ± 71,6**	1150 ± 41,7	1280 ± 66,7*	2175 ± 126**	1410 ± 64**	10,07 ± 0,65	10,05 ± 0,57**	9,92 ± 0,57**	9,95 ± 0,43**	5,88 ± 0,37	9,93 ± 0,5**	1,03 ± 0,11

Примечание. В сравнении с контролем (здоровые доноры): * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$.

Таблица 2
Уровень С3 и С3(Н₂О) при инкубации плазмы крови больных ходжкинскими (ХЛ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) в сравнении со здоровыми донорами (контроль)

Время инкубации плазмы, час	С3, мкг/мл						С3(Н ₂ О), мкг/мл							
	1,5	3	5	7	9	11	24	1,5	3	5	7	9	11	24
Здоровые (n = 12)	1024 ± 49	625 ± 42,2	524 ± 28,3	648 ± 31,8	676 ± 43,2	897 ± 52,8	518 ± 24	10,06 ± 0,4	4,43 ± 0,27	4,05 ± 0,25	4,3 ± 0,21	3,96 ± 0,28	4,12 ± 0,29	3,23 ± 0,16
Больные ХЛ (n = 14)	874 ± 62,5	1049 ± 68,5**	1342 ± 65,5**	1343 ± 64,5**	1075 ± 70,8**	1345 ± 72,3**	963 ± 67,7**	9,97 ± 0,55	9,89 ± 0,52**	7,48 ± 0,27**	7,52 ± 0,51**	9,86 ± 0,91**	5,92 ± 0,45*	5,11 ± 0,3**
Больные НХЛ (n = 16)	952 ± 46,5	1396 ± 81,7**	1050 ± 60,5**	1250 ± 97,1**	475 ± 25,5*	1197 ± 57,7*	800 ± 50,3**	10,04 ± 0,59	3,9 ± 0,21	9,96 ± 0,52**	5,89 ± 0,45*	9,92 ± 0,75**	5,5 ± 0,34*	4,9 ± 0,32**

Примечание. В сравнении с контролем (здоровые доноры): * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$.

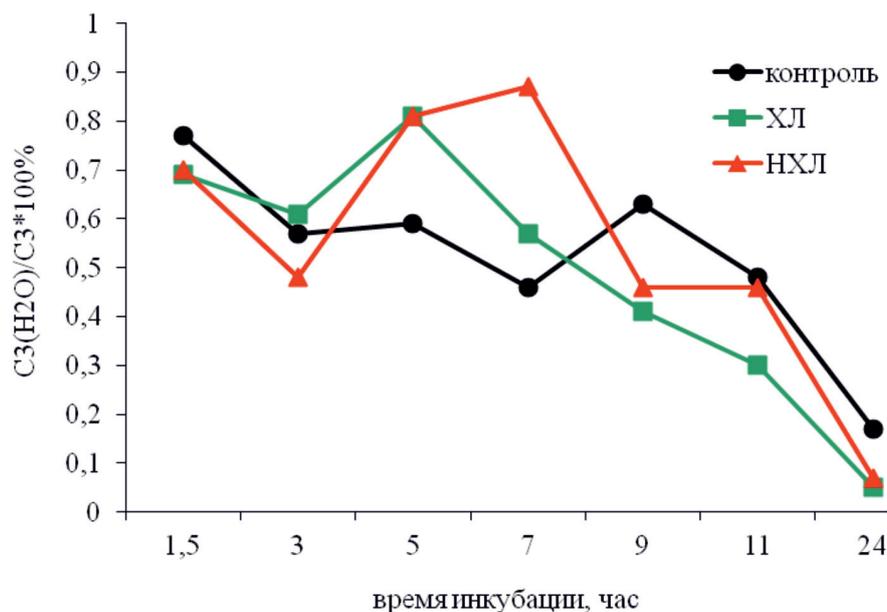


Рис. 1. Изменение уровня $C3(H_2O)/C3*100\%$ при инкубации сыворотки крови больных ходжкинскими (ХЛ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) в сравнении с контролем

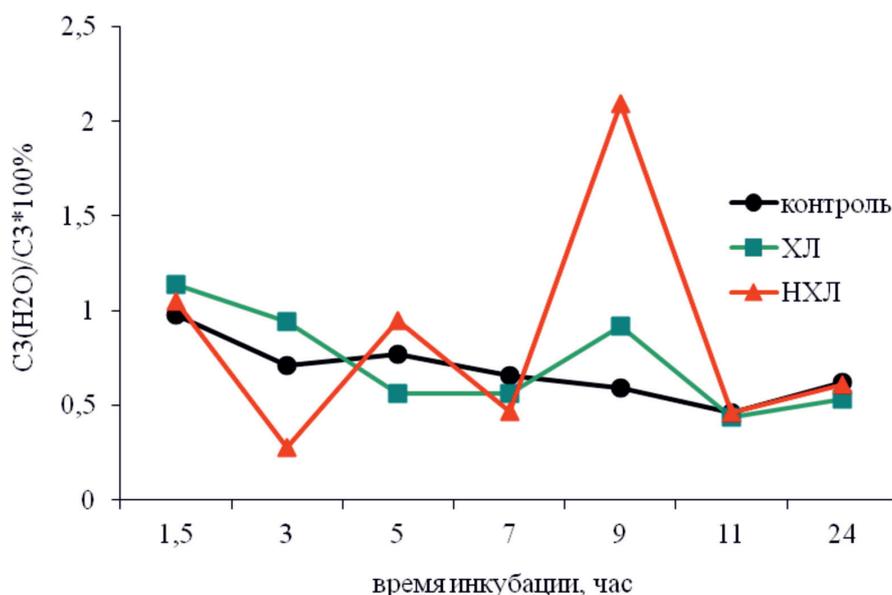


Рис. 2. Изменение уровня $C3(H_2O)/C3*100\%$ при инкубации плазмы крови больных ходжкинскими (ХЛ) и неходжкинскими лимфомами (НХЛ) в сравнении с контролем

На рис. 1–2 показано, что доля $C3(H_2O)$ от $C3$ (%) у больных ХЛ, НХЛ и здоровых людей на протяжении 24 часов инкубации сыворотки и плазмы изменялась различным образом. В сыворотке (рис. 1) разница между ХЛ и контролем наблюдалась через 5, 7 (при ХЛ выше, чем в контроле), 9, 11 и 24 часа инкубации (в контроле выше, чем при ХЛ). У больных НХЛ данный показатель превышал контроль так же, как и при ХЛ,

через 5 и, в большей степени, через 7 часов инкубации сыворотки.

В плазме крови (рис. 2) резкое увеличение показателя $C3(H_2O)/C3$ наблюдалось позднее – через 9 часов инкубации.

Обсуждая причины данного феномена, мы исходили из того, что появление дополнительного количества белков при опухолевых заболеваниях способствует увеличению модифицированных белков.

Конформационный переход белка при его функционировании чаще всего осуществляется на уровне субъединичных и субдоменных структур, а основные модули остаются более или менее интактными. При лигандировании такие белки часто присоединяют избыточное количество лиганда и таким образом еще больше модифицируются [1]. Так, например, для IgG была доказана зависимость его конформации и свойств от взаимодействия с амфифильными лигандами [2].

Поэтому при опухолевых заболеваниях, сопровождающихся деструктивными процессами опухолевых клеток и тканей, обнаруживаются качественно измененные IgG, отличающиеся от нормальных иммуноглобулинов повышенной конформационной ригидностью. Можно полагать, что белок C3 при неопластических процессах также претерпевает модификационные изменения, вызванные появлением большего (по сравнению со здоровыми донорами) количества нуклеофилов, которые обнажают тиоэфирную связь, что делает ее доступной для МКА, взаимодействующих с антигенной детерминантой, расположенной на C3(H₂O). Кроме того, при неопластических процессах увеличивается количество протеолитических ферментов, которые расщепляют C3, роль которых доказывает то, что в сыворотке крови, где ферменты не блокированы ЭДТА, увеличение уровня конформационной формы C3(H₂O) наблюдалось раньше, чем в плазме.

Подобные изменения наблюдались в плазме крови больных раком молочной железы [2], а также у мышей с привитой миеломой Sp 2/0 Ag14 [8].

В эксперименте на мышях линии BALB/c с привитой миеломой было показано, что после двухнедельной терапии животных комплексным препаратом из синтезированных двухвалентных глюконатов 3d-металлов (Mn, Fe, Co, Cu и Zn), приготовленных в физиологических concentra-

циях, которые, как было нами показано ранее, обладают иммуномодулирующими свойствами [9], происходила коррекция профиля гидролиза C3.

Таким образом, различия в профиле спонтанного гидролиза C3 компонента комплемента при инкубации сыворотки и плазмы крови онкобольных и здоровых лиц могут быть использованы в качестве дополнительного биохимического маркера при диагностике онкологических заболеваний.

Список литературы

1. Троицкий Г.В. Дефектные белки: постсинтетическая модификация / Г.В. Троицкий. – Киев: Наук. думка, 1991. – 232 с.
2. Князева О.А. Комплемент и антитела при онкологических заболеваниях. Результаты исследований. / О.А. Князева, Ф.Х. Камиллов. – Германия: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2011. – 284 с.
3. Chen Z.A., Pellarin R., Fischer L., Sali A., Nilges M.L., Barlow P.N., Rappsilber J. Structure of complement C3(H₂O) revealed by quantitative cross-linking/mass spectrometry and modeling // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2016. – vol. 15, № 8. – P. 2730–2743. DOI: <https://doi.org/10.1101/056457>.
4. Klapper Y., Hamad O.A., Teramura Y., Leneweit G.G., Nienhaus U., Ricklin D., Lambris J.D., Ekdahl K.N., Nilsson B. Mediation of a non-protolytic activation of complement component C3 by phospholipid vesicles // *Biomaterials*. – 2014. – vol. 35(11). – pp. 3688–3696. DOI: 10.1016.
5. Sahu A., Lambris J.D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity // *J. Immunol.* – 2001. – vol.180. – P. 35–48.
6. Bexborn F., Andersson P.O., Chen H., Nilsson B., Ekdahl K.N. The Tick-Over Theory Revisited: Formation and Regulation of the Soluble Alternative Complement C3 Convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol.* – 2008. – vol. 45(8). – P. 2370–2379.
7. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / Под руководством проф. И.В. Поддубной, проф. В.Г. Савченко. – М.: Медиа Медика, 2013. – 104 с.
8. Уразаева А.И. Механизмы влияния эфирных масел (*Lavandula vera*, *Salvia sclarea* и *Eucalyptus globulus*) на рост и развитие мышинной миеломы Sp 2/0 Ag14 на фоне хронического стресса: дис. ... канд. мед., наук. – Екатеринбург, 2015. – 147 с.
9. Князева О.А. Роль соединений глюконовой кислоты с 3d-металлами в коррекции индуцированного иммунодефицита у мышей / О.А. Князева, С.А. Усачев, С.И. Уразаева // *Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке*. – 2016. – № 18(4). – С. 88–93.