

УДК 612.124.017:577.15

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ С3-КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МЕМБРАНОЙ КРОЛИКА КАК ВОЗМОЖНЫЙ СПОСОБ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА ПО АЛЬТЕРНАТИВНОМУ ПУТИ

П. П. Бельтюков, Н. Б. Симкина*

(Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022, ул. Л. Толстого, 6/8, факс: (812) 234-01-25; e-mail: biochem@spmu.rssi.ru)

В работе показана способность отмытых теней эритроцитов кролика активировать очищенный фактор С3 системы комплемента *in vitro*. Выказано предположение, что такая активация, возможно, является результатом протеолитического гидролиза С3 в присутствии мембран эритроцитов кролика. Приведенные экспериментальные данные подтверждают это предположение. Показано, что воздействие ингибиторов протеолитических ферментов (соевый ингибитор трипсина, С1-ингибитор), ведет к дозозависимому снижению активации С3 тенями эритроцитов.

Центральную роль в активации комплемента как классическим, так и альтернативным путем, играет С3-компонент, участвуя в образовании С5-конвертаз. Известно два механизма инициации активации С3, проходящей альтернативным путем. Во-первых, это формирование жидкофазного С3(Н₂О) в результате неферментативного гидролиза внутренней тиол-эфирной связи при контакте с «активаторами». Во-вторых, образование жидкофазного С3b при протеолитическом расщеплении С3 комплексной протеиназой (С3-конвертазой), который может связываться с активными центрами на клеточной поверхности или с некоторыми молекулами, способными прочно нековалентно связываться с этим белком (полисахариды, иммуноглобулины и т.д.). Образование жидкофазного С3(Н₂О) или связанного с мембранами С3b необходимо для формирования С3(Н₂О)В или С3bВ – природного субстрата для фактора D.

В процессе активации комплемента компонент С3 подвергается гидролизу магний- или кальций-зависимой С3-конвертазой классического или альтернативного пути. Существуют и другие возможности расщепления этого белка, в том числе и протеиназами из его естественного окружения. Описан гидролиз С3 под действием активированных плазменного калликреина и фактора Хагемана, а также некоторых мембранных протеиназ [1]. Среди таких мембранных протеиназ можно выделить ферменты с калликреиновой или подобной активностью на поверхности человеческих и бычьих эритроцитов [1], а также цистеиновые мембранные протеиназы меланомных клеток [2]. Все перечисленные ферменты обладают способностью гидролизовать С3.

До настоящего времени остается неясным, является ли расщепление С3 этими протеиназами одним из проявля-

ний их специфической биологической роли. Высказываются предположения о том, что одна из функций таких мембранных протеиназ связана с защитой клеток от действия иммунной системы.

В наших экспериментах мы исследовали активацию очищенного компонента С3 при его инкубации с тенями эритроцитов кролика и некоторые особенности этого процесса.

Материалы и методы

В экспериментах использовали импортные и отечественные химические реактивы квалификации не ниже «ч.д.а.». Эритроциты кролика использовали для приготовления теней непосредственно в день забора крови.

В качестве источника С3 и С1-ингибитора использовали смешанную сыворотку здоровых доноров. С3 выделяли по [3], С1-ингибитор получали по [4]. Реагент RC3 для оценки гемолитической активности С3 получали путем инкубации человеческой сыворотки с монометиламином по [5]. Тени эритроцитов кролика готовили путем осмотического гемолиза в 0,015 М растворе хлорида натрия. Затем тени ресуспендировали в этом же растворе и трижды отмывали в физиологическом растворе с последующим центрифугированием и отделением супернатанта в течение 10 мин при 3000 об/мин. В экспериментах использовали суспензию теней, имеющую экстинкцию от 0,095 до 0,105 ($\lambda = 800$ нм, $l = 5$ мм). В качестве объекта для действия комплемента использовали стандартную взвесь эритроцитов кролика с поглощением 0,57–0,60 ($\lambda = 800$ нм, $l = 5$ мм) при разведении в 8 раз в физиологическом растворе. Гемолиз оценивали кинетическим методом [6]. Гемолитическая система состояла из 0,2 мл RC3, 0,2 мл 0,005 М медуналового буфера

*Адресат для переписки.

(рН 7,4) и 0,3 мл физиологического раствора, содержащего С3-компонент комплемента и суспензию или супернатант теней. Смесь инкубировали в течение 3 мин при 37°, после чего инициировали гемолиз добавлением 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов кролика и регистрировали кинетику через каждые 5 с до полного завершения процесса гемолиза.

В экспериментах по исследованию влияния теней эритроцитов кролика на активность С3 суспензию теней инкубировали с компонентом С3 при 37° в течение 6–24 ч. При таких условиях ни в одном из исследованных образцов не был зарегистрирован микробный рост. Для оценки влияния ингибиторов на активацию С3-компонента тени эритроцитов перед смешиванием с С3 предварительно обрабатывали соевым ингибитором трипсина или С1-ингибитором. Не связавшийся ингибитор удаляли путем разведения инкубационной пробы физиологическим раствором в ~250 раз с последующим центрифугированием. Преципитат теней отделяли и ресуспендировали в исходном объеме физиологического раствора.

Результаты и их обсуждение

Сведения об активации комплементзависимого гемолиза эритроцитов по альтернативному пути при добавлении в гемолитическую систему лизата эритроцитов ранее были приведены в [7, 8]. Зависимость скорости комплемент-опосредованного гемолиза в присутствии возрастающих количеств лизата эритроцитов приведена на рис. 1.

Авторы работы объясняют факт ускорения гемолиза развитием реактивного лизиса. Явление реактивного лизиса обусловлено образованием С5b в жидкой фазе (продукта активации, осуществляемой по классическому или альтернативному пути) с последующим формированием комплекса С5b6, способного совместно с компонентом С7 внедряться в близлежащие клетки [9].

Таким образом, для развития реактивного лизиса необходимо предварительное образование жидкофазного С5b. Это может происходить только в присутствии С5-конвертазы и ее субстрата – компонента С5. Поэтому ускорение комплемент-зависимого гемолиза в присутствии лизата или теней эритроцитов не может объясняться только наличием реактивного лизиса.

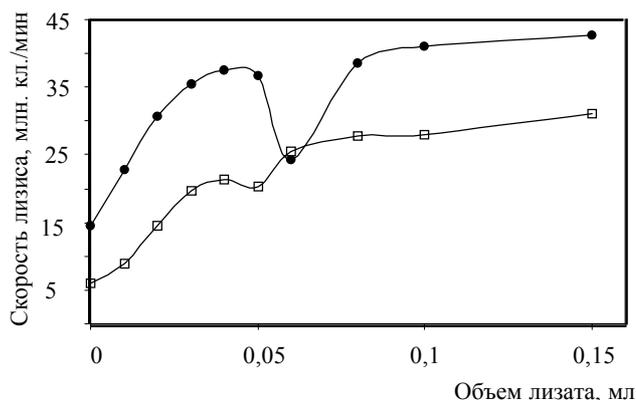


Рис. 1. Влияние лизата на скорость комплемент-зависимого лизиса эритроцитов кролика по альтернативному пути

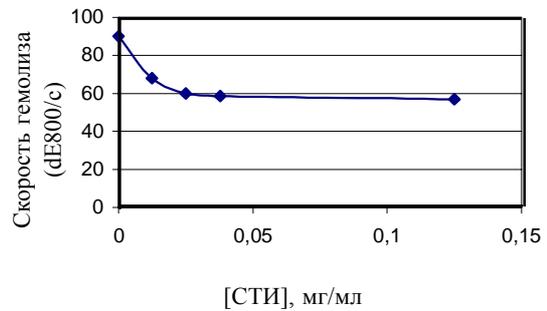


Рис. 2. Влияние соевого ингибитора трипсина на процесс активации С3 тенями эритроцитов кролика

Для выяснения возможности непосредственного влияния теней эритроцитов на очищенный белок С3 нами был проведен ряд экспериментов, результаты которых представлены в таблице.

Активность С3 в гемолитической системе оценивали по скорости гемолиза в системе, содержащей реагент RC3 и очищенный С3 (концентрация С3 в экспериментах составляла ~0,14 мг/мл).

Предварительно прогретые тени (50°, 30 мин) теряли до 40–50% от своей активирующей способности, что указывает на белковую природу компонента мембраны, участвующего в активации С3.

Как видно из приведенных в таблице данных, гемолитическая активность медленно снижается в процессе инкубации С3 в течение 6–24 ч. Если время инкубации превышает 24 ч, эффект активации становится незаметным.

Обработанный С3, отделенный от теней путем центрифугирования, проявлял повышенную гемолитическую активность. Снижение активации в присутствии протеиназных ингибиторов подтверждает наши предположения о том, что процесс активации С3 имеет протеолитическую природу.

Попытка получить аналогичный эффект при использовании теней эритроцитов барана не увенчалась успехом. Известно, что эритроциты барана, в отличие от эритроцитов кролика, не обладают способностью активировать альтернативный путь, что может объясняться двумя причинами. С одной стороны, в мембранах эритроцитов барана содержится много сиаловых кислот, которые могут мешать взаимодействию поверхности мембраны с компонентом С3. С другой стороны, мембрана эритроцитов барана может не содержать протеиназ, способных гидролизовать С3 и запускать гемолиз по альтернативному пути.

Результаты экспериментов с соевым ингибитором трипсина показывают, что соевый ингибитор трипсина дозозависимо подавляет активацию С3 компонента. Полное ингибирование наступает при концентрации СИТ ~ 0,05 мг/мл (рис. 2).

В экспериментах по влиянию С1-ингибитора на эритроцитарную мембрану были получены аналогичные результаты.

Таким образом, по результатам экспериментов можно сделать вывод о наличии в мембранах эритроцитов кролика белкового компонента, обладающего протеолитической активностью и способного расщеплять очищенный

Активация С3 теньями эритроцитов кролика и ингибирование этого процесса соевым ингибитором трипсина

Образец	Гемолитическая активность С3 (% к контролю)			
	до инкубации	при времени инкубации, ч		
		60	12	24
С3 + "тени"	165,4±18,7	153,4±24,5	128,2±11,6	99,2±6,5
С3 после инкубации с теньями (супернатант)	105,6±11,2	149,5±18,7	109,4±9,6	91,0±5,2
С3 + тени, обработанные СИТ (0,0625 мг/мл)	100,2±5,5	98,5±8,1	95,4±6,5	96,6±5,0

Примечание. $n = 5$, $p < 0,05$.

компонент С3 при его инкубации с теньями эритроцитов. На протеолитический характер активации указывает дозозависимое угнетение этого процесса соевым ингибитором трипсина. Такое расщепление С3 ведет к увеличению

регистрируемой активности альтернативного пути комплемента и поэтому может рассматриваться как один из дополнительных механизмов активации альтернативного пути системы комплемента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferrera L.A., Bergamasco M., Henriques O.B // J. Protein Chem. 1994. **13**. P. 547.
2. Frade R. // Immunopharmacology. 1999. **42**. P. 39.
3. Козлов Л.В., Шибанова Е.Д., Зинченко А.А. // Биохимия. 1987. **52**. С. 660.
4. Reboul A., Arlaud G.J., Sim R.B., Colomb M.G. // FEBS Lett. 1977. **79**. P. 45.
5. Jessen T.E., Barkholt V., Welinder K.G. // J. Immunol. Methods. 1983. **60**. P. 89.
6. Халяпин Б.Д., Прокопьев А.А. // Иммунология. 1986. № 3. С. 66.
7. Рюмина Е.В., Галевская Л.В., Щербак И.Г // Деп. ВИНТИ 5868-В90.
8. Галевская Л.В. // Вопросы мед. химии. 1988. **44**. № 5. С. 501.
9. Kitamura H., Tsuboi M. // Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol. 1985. **78**. P. 101.

Поступила в редакцию 20.06.00