

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

УДК 577.112

©Л.В.Галебская

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ САМОРЕГУЛЯЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНОГО ПУТИ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА

Л.В.ГАЛЕБСКАЯ

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.
И.П.Павлова, 197089, Санкт-Петербург, ул Л.Толстого, 6/8, факс (812)234-01-25

Обзор собственных экспериментальных и литературных данных об особенностях саморегуляции и регуляции альтернативного пути активации комплемента (АПК). Обсуждены методы оценки АПК, включая новый критерий - гемолитическую емкость комплемента. Показано, что лимитирующим звеном, определяющим продолжительность индукционного периода комплементзависимого гемолиза по АПК является концентрация фактора D. Описан эффект ускорения гемолиза по АПК под действием мембран лизированных клеток, что свидетельствует о функционировании этого пути в режиме двойной амплификации.

Ключевые слова: комплемент, сыворотка крови

ВВЕДЕНИЕ. Система комплемента является важной частью иммунологической защиты человеческого организма. Основным проявлением ее функционирования является лизис клеток. Активация комплемента может происходить одним из двух путей: классическим (КПК) или альтернативным (АПК), отличающимися начальными стадиями процесса. В реакциях АПК участвуют сывороточные белки: фактор В, фактор D и компонент C3, а также ионы магния.

КАСКАД АПК. Характерной особенностью АПК является неферментативный способ его инициации, заключающийся в спонтанном гидролизе компонента C3 [1]. Этот белок содержит лабильную тиоэфирную связь, гидролиз которой приводит к появлению у молекулы способности образовывать комплекс с фактором В. Комплекс C3(H₂O)V является субстратом высокоспецифичной протеиназы, именуемой "фактор D". В результате отщепления фрагмента Ba от комплекса образуется начальная конвертаза альтернативного пути C3(H₂O)Bb [2]. Этот фермент способен катализировать реакцию гидролиза компонента C3 на C3a и C3b. Белок C3b по своим свойствам очень близок к спонтанно гидролизованному C3: он образует комплекс с фактором В и обеспечивает расщепление последнего под действием фактора D с образованием конвертазы альтернативного пути C3bBb [3]. Вместе с тем, у C3b и C3(H₂O) имеются различия. Первое из них заключается в том, что C3b, в отличие от C3(H₂O), может эффективно функционировать только будучи ковалентно связанным с поверхностью клетки-мишени [4]. Кроме того, включение в конвертазу C3bBb дополнительных молекул C3b придает ферменту способность катализировать реакцию гидролиза еще одного белка, а именно

компонента C5, с образованием фрагментов C5a и C5b. Ферментативная выработка C3b приводит к лавинообразному ускорению гидролиза компонента C5, обозначаемому термином "амплификация". Таким образом АПК постоянно функционирует в режиме амплификации.

Гидролиз компонента C5 является решающим событием в комплементзависимом цитолизе, т.к. приводит к формированию мембраноатакующего комплекса (МАК). Процесс формирования МАК представляет собой специфическую сорбцию на белке C5b компонентов C6, C7, C8 и C9. По мере последовательного присоединения белков гидрофобность комплекса увеличивается, что и обеспечивает его внедрение в клеточную мембрану [5].

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АПК. Изучение регуляции и саморегуляции комплемента, как правило, проводится с использованием гемолитических методов. При этом оценку активности АПК осуществляют либо с помощью величины AP50, которую определяют как степень комплементзависимого гемолиза [6] в стандартных условиях, либо по времени лизиса половины от добавленных к комплементу гетерологичных эритроцитов, т.е. величине t50 [7]. В обоих случаях оценка активности комплемента является односторонней. Нами была предпринята попытка исследования регуляторных механизмов в АПК с использованием новых методических приемов. Так, при анализе кинетических кривых комплементзависимого гемолиза вместо общепринятой величины t50 нами раздельно рассматривались два параметра: индукционный период (lag-t) [8] и скорость гемолиза (Vh) [9]. Lag-t измеряли от момента смешивания источника комплемента с эритроцитами кролика (инициаторы и мишени для действия АПК) до начала их лизиса, регистрируемого по убыли оптической плотности при 800 нм. Скорость гемолиза определяли как тангенс угла наклона кинетической кривой в области ее максимального перегиба и выражали в млн. эритроцитов, лизируемых за 1 минуту. Исключение инициации КПК эритроцитами кролика достигалось добавлением в среду ЭГТА, избирательно хелатирующего ионы кальция. Кроме такой детализации анализа кинетических кривых, нами (в соавторстве с И.Г.Щербаком и Е.В.Рюминой) был введен новый параметр оценки состояния комплемента: гемолитическая емкость комплемента (ГЕК). Ее определяли путем последовательного добавления в биологическую жидкость, содержащую комплемент, дискретных порций гетерологичных эритроцитов вплоть до полного истощения системы, проявляющейся в отсутствии лизиса очередной из добавляемых порций. ГЕК показывает, какое максимальное количество эритроцитов может быть полностью лизировано единицей объема биологической жидкости. Следовательно, этот параметр позволяет дать строгую количественную характеристику функционального потенциала системы.

Ключевые звенья в АПК. Применение новых методических приемов позволило выявить ряд особенностей функционирования АПК. Так, при анализе зависимости параметров комплементзависимого гемолиза по АПК от содержания в сыворотке крови участников процесса была выявлена определяющая роль концентрации фактора D в продолжительности индукционного периода. В таблице 1 приведены величины lag-t и Vh лизиса эритроцитов кролика по АПК при возрастающих концентрациях факторов B и D.

Видно, что при повышении концентрации этих белков сначала наблюдается реципрокность изменений показателей: уменьшение lag-t при возрастании Vh. При дальнейшем повышении концентрации факторов скорость лизиса достигает максимума (табл. 1 и работа [10]). При этом, если в экспериментах с фактором B индукционный период также достигает некоторого постоянного уровня, соответствующего средним значениям lag-t сыворотки здорового человека, то в опытах с фактором D наблюдается уменьшение индукционного периода и после достижения максимальной скорости. Графический анализ показал обратно пропорциональную связь между продолжительностью индукционного периода и концентрацией фактора D, что позволяет

считать этот фермент лимитирующим фактором для данного показателя. Обнаруженный факт позволяет предложить величину $1/\text{lag-t}$ в качестве характеристики активности фактора D. В работе Nielsen et al. [7] отмечен некоторый вклад (18%) фактора D в лимитирование комплементзависимого гемолиза по АПК. Однако, при этом активность комплемента авторы характеризовали величиной $1/t_{50}$. Вместе с тем, t_{50} складывается из двух разных временных параметров: индукционного периода и времени лизиса половины эритроцитов. Таким образом, использованный в работе показатель содержит компонент (время лизиса половины эритроцитов), независимый от активности фактора D (в исследованном диапазоне его концентраций), что и привело к заниженной оценке роли фактора D в лимитировании АПК. Выявленная нами связь между уровнем активности фактора D и величиной индукционного периода по АПК может быть использована на практике. В частности, известны данные о повышении сывороточной концентрации фактора D у больных с хронической почечной недостаточностью [11]. Проведенное нами в связи с этим определение параметров комплементзависимого гемолиза по АПК в сыворотке крови таких больных ($n=7$) выявило 2-3-х кратное снижение величины lag-t по сравнению с контролем при сохранении нормальной скорости гемолиза.

Таблица 1. Зависимость параметров комплементзависимого лизиса эритроцитов кролика (ЭК) от концентрации факторов В и D.

Фактор	D				B				
Концентрация фактора (мкг/мл)	2	4	8	12	30	42	60	120	600
V_h (млн.ЭК за 1 мин)	2,9	5,0	5,9	6,0	1,9	3,1	4,9	8,8	8,6
lag-t (с)	300	240	180	45	420	360	270	170	180

Исследование динамики комплементзависимого гемолиза по АПК. В ходе определения гемолитической емкости комплемента осуществляется регистрация параметров лизиса каждой из добавляемых порций эритроцитов. Динамика изменений скорости гемолиза характеризуется при наличии обоих путей активации комплемента (как КПК, так и АПК) постепенным уменьшением скорости лизиса каждой последующей порции клеток, что продемонстрировано на рис. 1.

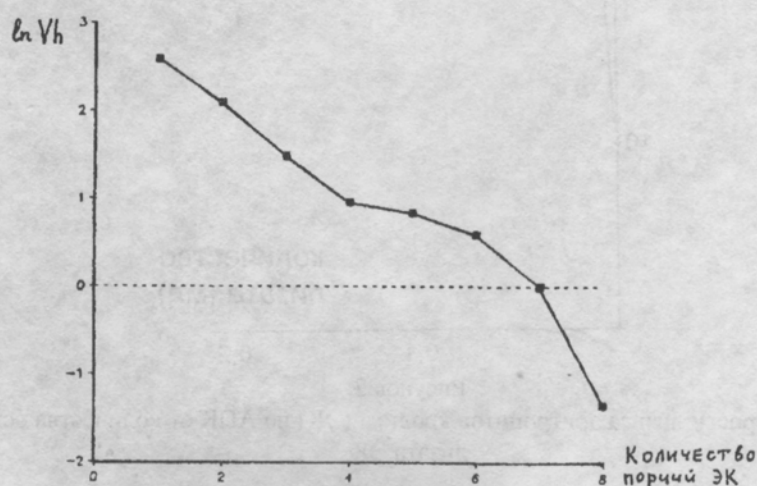


Рисунок 1.

Динамика истощения комплемента сыворотки крови человека эритроцитами кролика (величина отдельной порции ЭК - 0,72 млн. клеток).

При регистрации динамики истощения комплемента в условиях активации только АПК (т.е. в присутствии ЭГТА) картина оказалась совершенно иной. После лизиса первой порции ЭК вместо снижения скорости лизиса наблюдалось выраженное ее повышение. Поскольку лизис второй и последующих порций ЭК протекает в присутствии продуктов лизиса эритроцитов, было выдвинуто предположение о том, что упомянутый ускоряющий эффект обусловлен продуктами лизиса эритроцитов кролика. Для проверки этого предположения мы исследовали влияние осмотического лизата кроличьих эритроцитов на лизис ЭК по альтернативному пути и, для сравнения, на лизис ЭК по классическому пути, а именно в сыворотке крови, избирательно лишенной фактора D (реагент RD). Результаты представлены в таблице 2. Как следует из данных таблицы, лизат ЭК оказывает значительный эффект в отношении активации комплемента как по АПК, так и по КПК. При этом воздействие лизата на эти пути имело различный характер. Умеренное и дозозависимое угнетение отмечено в отношении КПК. Вместе с тем, тот же лизат очень значительно (в 2-4 раза) ускорял лизис по АПК.

Таблица 2. Влияние осмотического лизата эритроцитов кролика на активность комплемента сыворотки крови человека (n=5) по КПК (в RD) и АПК (в присутствии ЭГТА).

Количество лизата (мл)	% ингибирования КПК	% активации АПК
0,02	42 ± 13	203 ± 102
0,05	66 ± 7	206 ± 68
0,1	79 ± 8	217 ± 97

При более детальном исследовании влияния различных количеств лизата на АПК обнаружено, что зависимость V_h от количества внесенного в инкубационную смесь лизата имеет сложный характер (рис. 2).

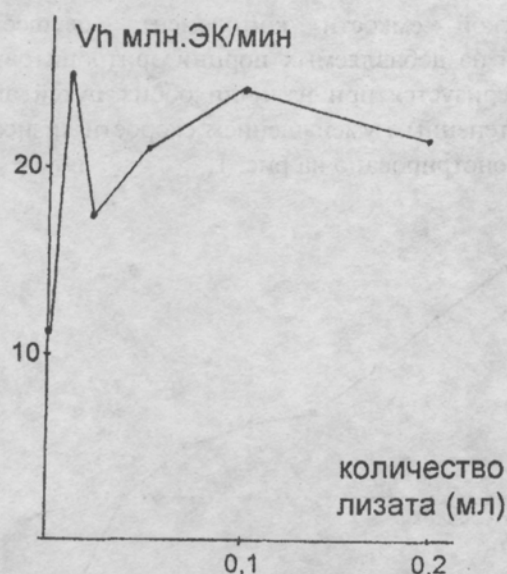


Рисунок 2.

Зависимость скорости лизиса эритроцитов кролика (ЭК) по АПК от количества осмотического лизата ЭК.

Компонент лизата, ускоряющий лизис ЭК, оказался чувствительным к нагреванию, процедуре замораживания-оттаивания и к обработке парахлормеркурибензоатом. Исследование влияния на комплементзависимый гемолиз компонентов лизата эритроцитов показало, что за эффект ускорения гемолиза ответственны тени лизированных клеток. Этот факт, а также практическое отсутствие

влияния лизата на продолжительность индукционного периода позволили предположить, что в основе ускоряющего эффекта лизата лежит явление реактивного лизиса [12]. Тени ЭК обладают способностью инициировать АПК. В результате наблюдается продукция комплексов C5b6, которые могут внедряться в еще не разрушенную клетку, ускоряя ее лизис. Если комплекс C5b6 не внедряется в клетку-мишень, он быстро инактивируется белком S. Нами было показано, что если вторую порцию ЭК добавлять не сразу после завершения лизиса первой порции, а после 15-минутной инкубации, ускоряющий эффект теней исчезает. Обнаруженное явление ускорения комплементзависимого лизиса ЭК тенями лизированных клеток мы обозначили термином "двойная амплификация". АПК постоянно функционирует в условиях амплификации, а образующиеся продукты гемолиза в еще большей степени ускоряют процесс, т.е. обуславливают необычную форму функционирования АПК в режиме двойной амплификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Law S.K. (1983) *Biochem. J.*, 211, 381-389.
2. Fishelson Z., Pangburn M.K., Muller-Eberhard H.J. (1984) *J. Immunol.*, 132, 1430-1434.
3. Fishelson Z., Muller-Eberhard H.J., Pangburn M.K. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 7411-7422.
4. Pangburn M.K., Schreiber R.D., Muller-Eberhard H.J. (1983) *J. Immunol.*, 131, 1930-1935.
5. Podack E.R., Biesecker G., Muller-Eberhard H.J. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 76, 897-901.
6. Servias G., Walmagh J., Duchateau J. (1991) *J. Immunol.*, 140, 93-100.
7. Nielsen H.E., Larsen S.D., Vikigsdottir T. (1992) *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 100, 1053-1060.
8. Гвоздецкий А.Н., Иванов А.А. (1980) *Иммунология*, N5, 51-54.
9. Халятин Б.Д., Прокопьев А.А. (1986) *Иммунология*, N3, 66-69.
10. Галевская Л.В., Щербак И.Г., Бельтюков П.П., Рюмина Е.В., Соловцова И.Л. (1993) *Биохимия*, 58, 1796-1800.
11. Pascual M., Paccaud J.P., Macon K. (1989) *Clin Nephrol.*, 32, 185-193.
12. Thompson R.A., Rowe D.C. (1968) *Immunology*, 14, 745-762.

NEW APPROACHES IN THE STUDY OF COMPLEMENT ALTERNATIVE PATHWAY SELF-REGULATION

L.V.GALEBSKAYA

Saint-Petersburg State Pavlov Medical University

Experimental and literary data on the peculiarities of complement alternative pathway (APC) self-regulation and regulation are reviewed. There is a discussion of the methods of APC evaluation, including a new one, called complement hemolytical capacity. It is shown that the duration of complement-dependent hemolysis lag-period is limited by factor D concentration. The phenomenon of acceleration of APC-dependent hemolysis by membranes of lysed cells is described. The latter is an evidence of APC functioning in the mode of double amplification.

Key words: complement, self-regulation, blood serum.