

УДК 577.112

©Коллектив авторов

МОДИФИКАЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО КАСКАДА КОМПЛЕМЕНТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННОГО ГЕПАРИНА

Л.В.ГАЛЕБСКАЯ, И.Л.СОЛОВЦОВА, Е.В.РЮМИНА

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад.
И.П.Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого 6/8, факс (812)234-01-25

Исследовано влияние терапевтических концентраций гепарина (0,25-10 ед./мл) на кинетические показатели активности комплемента сыворотки крови человека. Обнаружено ускорение комплемент-зависимого лизиса эритроцитов кролика по альтернативному пути в присутствии низких концентраций гепарина (0,25-0,50 ед./мл) и торможение комплемента более высокими (5 - 10 ед./мл) дозами препарата. Торможение альтернативного пути проявлялось, главным образом, в увеличении индукционного периода гемолиза. Гепарин в концентрациях, превышающих 1 ед./мл, вызывал дозозависимое снижение скорости лизиса эритроцитов барана при реципрокном увеличении гемолитической емкости комплемента, что указывает на более "экономное" расходование компонентов системы. Подобный эффект сохранялся также в сыворотке, дефицитной по фактору D альтернативного пути активации комплемента. Это свидетельствует о преимущественном ингибировании гепарином классического пути активации комплемента.

Ключевые слова: комплемент, сыворотка крови, гепарин

ВВЕДЕНИЕ. Гепарин широко применяется в клинической и лабораторной практике в качестве антикоагулянта. Вместе с тем, этот полианион способен взаимодействовать с широким спектром белков плазмы крови и тканей [1], в т.ч. не относящихся к системе свертывания крови. В частности, известно о способности гепарина воздействовать на каскад комплемента. Было показано, что из 22 белков системы комплемента, включая ее регуляторы, с гепарином взаимодействуют тринадцать [2]. Среди них - компоненты классического пути активации (C1q, C4, C2), альтернативного пути (факторы В, D, Р), терминальные компоненты комплекса мембранной атаки (C6, C8 и C9) и регуляторные белки

(C4bp, C1Inq, H, S). Кроме того, обнаружено связывание гепарином регуляторного фактора J [3].

В ходе активации системы комплемента выделяют три ключевые стадии, каждая из которых является объектом действия гепарина. Во-первых, гепарин может вызывать нарушение целостности комплекса C1 и препятствовать его воздействию на компоненты C2 и C4, что в свою очередь приводит к торможению формирования конвертазы классического пути [4]. Данное явление происходит как в растворе, так и на поверхности клетки - активатора комплемента. Во-вторых, гепарин нарушает процесс образования конвертазы альтернативного пути активации комплемента, C3bBb, препятствуя взаимодействию фактора В с C3b [5]. И, наконец, гепарин описан в качестве ингибитора реактивного лизиса, т.е. вещества, тормозящего повреждение клетки комплексом мембранной атаки [6].

Не все возможные способы взаимодействия гепарина с комплементом являются существенными и реально имеют место в плазме крови. Задачей настоящей работы явилось исследование влияния гепарина в его терапевтических концентрациях на показатели состояния комплемента сыворотки крови человека и установление стадий активации комплемента, наиболее чувствительных к его воздействию.

МЕТОДИКА. В качестве инициаторов и мишеней для действия комплемента использовали эритроциты кролика и барана. Эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором и помещали в изотонический вероналовый буфер (рН 7,2). Стандартная взвесь содержала 18 млн. клеток на 1 мл буфера. В части экспериментов эритроциты барана предварительно сенсibilизировали антисывороткой кролика [7].

Источником активности комплемента являлась сыворотка крови доноров или пациентов клиник СПбГМУ. Исследованные концентрации коммерческого препарата гепарина фирмы "Биохими" (Австрия) находились в диапазоне от 0,25 до 10 ед/мл, что соответствует терапевтическому уровню.

Оценку влияния гепарина на комплемент производили, используя следующие показатели состояния системы: время до наступления гемолиза или величина lag-периода, скорость комплемент-зависимого лизиса эритроцитов (V лизиса)[4]; гемолитическая емкость комплемента (ГЕК) [8]. Все показатели определяли кинетическим способом, регистрируя лизис клеток по убыли оптической плотности при 800 нм в термостатированной (37° С) кювете спектрофотометра [9]. Результаты выражали в процентах к контрольному уровню (без гепарина).

Для определения влияния гепарина на активацию комплемента по альтернативному пути лизис эритроцитов кролика регистрировали в присутствии 10 мМ ЭГТА, избирательно блокирующего классический путь. Воздействие гепарина на классический путь без амплификации со стороны альтернативного пути определяли в реагенте RD, т.е. сыворотке крови человека, предварительно лишенной фактора D. Реагент RD* получали путем избирательной сорбции фактора D из пула донорских сывороток на ионообменнике ДЕАЕ-Сефадекс А-50 [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты определения влияния гепарина на показатели активации комплемента по альтернативному пути в отношении эритроцитов кролика представлены в таблице 1.

Таблица 1. Показатели активности комплемента сыворотки крови человека по альтернативному пути в отношении эритроцитов кролика в присутствии гепарина (в % к контролю, n=5).

Концентрация гепарина (ед./мл)	Lag-период	V лизиса	ГЕК
0,25	75 ± 7*	149 ± 8*	100 ± 5
0,5	100 ± 5	114 ± 5*	100 ± 7
1,0	108 ± 5	98 ± 10	100 ± 9
5,0	134 ± 22*	96 ± 12	98 ± 10
10,0	135 ± 15*	70 ± 10*	100 ± 10

Примечание: * p < 0,01

Из данных таблицы видно, что воздействие гепарина на активацию комплемента по альтернативному пути не однозначно. При низких концентрациях гепарина (0,25-0,5 ед./мл) наблюдается ускорение комплемент-зависимого гемолиза. Причем в концентрации 0,25 ед./мл это ускорение сочетается с существенным уменьшением индукционного периода. Вероятно, наблюдаемая нами активация альтернативного пути обусловлена описанным в литературе явлением повышения активности фактора D комплемента низкими дозами гепарина (0,01 ед./мл) в системе, составленной из очищенных компонентов альтернативного пути: белков C3, B и D [11]. Активность фактора D авторы регистрировали по приросту продукта его протеолиза – полипептида Bb. Как свидетельствуют наши данные описанный феномен проявляет себя не только в модельных опытах, но и в условиях, приближенных к физиологическим (сыворотка крови – чужеродная клетка).

При относительно высоких концентрациях гепарина (5 - 10 ед./мл) – наблюдается торможение альтернативного пути активации комплемента, которое проявляется не столько в уменьшении скорости гемолиза, сколько в увеличении lag-периода. Возможно, в этом случае мы наблюдаем процесс торможения гепарином сборки конвертазы альтернативного пути.

Обращает на себя внимание то, что как в активирующих, так и в ингибирующих концентрациях гепарин не влияет на гемолитическую емкость комплемента (ГЕК). Отсутствие влияния изученных концентраций гепарина на гемолитическую емкость комплемента в отношении эритроцитов кролика свидетельствует об отсутствии истощения компонентов альтернативного пути активации комплемента в присутствии гепарина, т.е. указывает на сохранение потенциала этой системы в гепаринизированной крови.

В отличие от эритроцитов кролика, эритроциты барана первично инициируют классический путь активации комплемента. Как следует из данных таблицы 2, гепарин оказывает выраженный дозозависимый эффект в отношении параметров лизиса комплементом клеток по этому пути. Влияние гепарина существенно не зависит от степени сенсibilизации эритроцитов и проявляется в уменьшении скорости лизиса при реципрокном повышении гемолитической

емкости. Увеличение lag-периода наблюдалось не во всех исследованных сыворотках, реакция на гепарин этого показателя отличалась наибольшей вариабельностью. Таким образом, наиболее значительные и однонаправлено зависимые от концентрации изменения, связанные с присутствием экзогенного гепарина, наблюдаются со стороны комплемент-зависимого лизиса эритроцитов барана, т. е. инициаторов классического пути. Однако, в ходе инициации классического пути происходит "подключение" альтернативного пути, т.е. наблюдается явление амплификации. Обнаруженное нами торможение лизиса эритроцитов барана может быть обусловлено нарушением процесса формирования и функционирования C1 и/или сборки амплификационной конвертазы. С целью выяснения наиболее уязвимого к ингибированию гепарином звена комплементного каскада было изучено воздействие гепарина на реагент RD, т. е. сыворотку, дефицитную по компоненту альтернативного пути - фактору D. Результаты одного из трех аналогичных опытов представлены на рисунке 1. В препарате RD, в котором невозможна амплификация из-за отсутствия компонента альтернативного пути, гепарин, точно так же как и в интактной сыворотке, вызывает дозозависимое снижение скорости лизиса и увеличение гемолитической емкости. Изменения lag-периода во всех трех экспериментах не наблюдалось. Полученные результаты свидетельствуют о том, что воздействие гепарина на комплемент-зависимый лизис эритроцитов барана обусловлено нарушением функции C1 классического пути активации комплемента. Увеличение гемолитической емкости согласуется с данным предположением, поскольку при уменьшении активности C1 значительно уменьшается потребление компонентов C2 и C4 [4], что и приводит к возрастанию потенциала системы.

Таблица 2. Влияние гепарина на показатели активации комплемента сыворотки крови человека эритроцитами барана (в % к контролю, n=7).

Концентрация гепарина (ед/мл)	Сенсибилизация эритроцитов	Lag-период	V лизиса	ГЕК
0,5	-	100 ± 5	101 ± 31	100 ± 16
1,0	-	109 ± 15	88 ± 11*	123 ± 19*
2,5	-	119 ± 23	71 ± 15*	141 ± 23*
5,0	-	134 ± 33	55 ± 12*	161 ± 24*
5,0	+	128 ± 36	54 ± 7*	121 ± 10

Примечание: * p < 0,01

Индивидуальный характер реакции lag-периода на присутствие гепарина, в условиях инициации классического пути активации, подкрепленной амплификацией со стороны альтернативного пути, вероятно, обусловлен отличиями в чувствительности различных генетических форм компонентов комплемента к данному веществу. Для человека характерен значительный полиморфизм компонентов C4, C2 факторов В и Н, способных специфически взаимодействовать с гепарином [2]. Возможно, разные генетические формы белков отличаются по сродству к гепарину и по реакции на присутствие гепарина можно будет идентифицировать ту или иную форму белка комплемента.

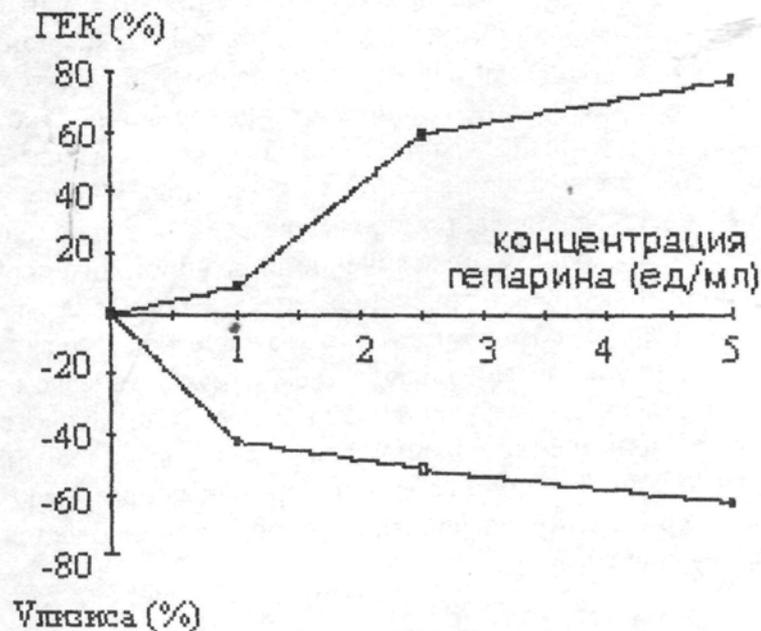


Рисунок 1.

Зависимость скорости лизиса эритроцитов барана и гемолитической емкости реagenta RD (сыворотка человека, дефицитная по фактору D) от концентрации гепарина.

Существенное влияние терапевтических концентраций гепарина на комплекс мембранной атаки представляется маловероятным, т.к. терминальная фаза протекает одинаково при активации комплемента как по классическому, так и по альтернативному путям, а по нашим данным выраженное торможение гепарином скорости лизиса эритроцитов барана сочетается с отсутствием существенного эффекта в отношении эритроцитов кролика.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что наиболее значительные изменения параметров активации системы комплемента гепаринизированной крови наблюдаются в отношении эритроцитов барана. В классическом пути активации комплемента наиболее чувствительным к действию гепарина оказался начальный этап формирования и функционирования комплекса C1. По данным литературы механизмом действия гепарина в этом случае является усиление торможения активированного первого компонента C1-ингибитором [13]. Этот факт наряду с нашими данными о выраженном функциональном проявлении эффекта позволяют предложить использование гепарина для терапии острых состояний, возникающих при недостаточности C1-ингибитора (врожденный и приобретенный ангионевротический отек). Кроме того, гепаринизация может быть использована в тех случаях, когда активация комплемента является фактором повреждения собственных клеток организма. Так, успешное применение гепарина в лечении острого инфаркта миокарда и инсульта обусловлено не только антикоагулянтным действием препарата, но и его способностью угнетать комплемент, поскольку показано, что величина зоны некроза при этих состояниях зависит от степени активации комплемента [14, 15]. Комплемент является компонентом иммунной системы. Несмотря на способность гепарина подавлять классический путь активации комплемента, его нельзя считать иммуносупрессором. Дело в том, что замедление каскада

комплемента гепарином сопровождается увеличением гемолитической емкости комплемента, т. е. более "экономным" расходом его компонентов.

ВЫВОДЫ. 1. Характер зависимости параметров альтернативного пути активации комплемента в отношении эритроцитов кролика от концентрации гепарина имеет трехфазный характер: активация в низких дозах (0,25-0,50 ед./мл), затем отсутствие влияния и торможение при уровне гепарина 5 - 10 ед./мл. Если активация проявляется преимущественно в ускорении гемолиза, то торможение, главным образом, в увеличении индукционного периода.

2. Гепарин в концентрациях 1 и более ед./мл оказывает тормозящее действие на активацию комплемента по классическому пути. Ингибирование комплемента сопровождается повышением гемолитической емкости, что свидетельствует о сохранении функционального потенциала системы.

3. В случае применения гепарина для ингибирования комплемента следует поддерживать его концентрацию на уровне, превышающем 1 ед./мл. При этом не происходит активации альтернативного пути, но уже наблюдается ингибирование классического пути активации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычков С.Н. (1981) *Вопр. мед. химии*, **27**, 726-736.
2. Sahu A., Pangburn M.K. (1993) *Mol. Immunol.*, **30**, 679-684.
3. Gonzales-Rubio C., Jimenez-Clavero M.A., Fontan G., Lopez-Trascasa. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26017-2624.
4. Raepple E., Hill H.U., Loos M. (1976) *Immunochemistry*, **13**, 251-255.
5. Weiler J.M., Yurt R.W., Fearon D.T., Austen K.F. (1978) *J. Exp. Med.*, **147**, 409-421.
6. Baker P.J., Lint T.F., McLeod B.C., Behrends C.L. Gewurz H. (1975) *J. Immunol.*, **114**, 554-558.
7. Кэбот Е., Майер М. (1968) *Экспериментальная иммунохимия*. М. Мир с. 156-157.
8. Щербак И.Г., Галевская Л.В., Рюмина Е.В. (1992) Патент РФ N 1532876. *Бюлл. Изобретения. Открытия*. М., N14, 188.
9. Халятин Б.Д., Прокотьев А.А. (1986) *Иммунология*, **N3**, 66-69.
10. Соляков Л.С., Козлов Л.В. (1983) *Биоорган. химия*, **N9**, 462-469.
11. Keil L.B., Himenez E., Guma et al. (1995) *Am. J. Hematol.*, **50**, 254-262.
12. Weiler J.M., Edens R.E., Linhavalt R.J., Kapelanski D.P. (1992) *J. Immunol.*, **148**, 3210-3218.
13. Caldwell E.E., Andreasen A.M., Blietz M.A. et al. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **361**, 215-222.
14. Yasuda M., Takeuchi K., Hiruma M. et al. (1990) *Circulation*, **81**, 156-163.
15. Huang J., Kim L.J., Mealey R. Et al. (1999) *Science*, **285**, 595-599.

Поступила 15.11.2000.

HUMAN COMPLEMENT CASCADE MODIFICATION BY EXOGENIOUS HEPARIN

L.V.GALEBSKAYA, I.L.SOLOVTZOVA, E.V.RYUMINA

Saint-Petersburg State Pavlov Medical University

The influence of heparin therapeutic concentrations (0.25-10 U/ml) on the kinetic indices of human serum complement activity has been studied. An acceleration of complement-dependent lysis of rabbit erythrocytes via alternative complement pathway was found at low (0.25-0.5 U/ml) heparin concentrations and complement inhibition at higher (5 -10 U/ml) concentration. The alternative pathway inhibition was revealed mainly by lag-period elongation of the hemolysis. Heparin in the concentrations more then 1 U/ml caused dose-dependent lowering of sheep erythrocytes hemolysis rate accompanied with reciprocal elevation of complement hemolytical capacity, which shows more "economical" consumption of complement components at heparin presence. The identical effect was observed in sera, deficient in factor D of alternative pathway of complement activation. This can be an evidence of the prevailing heparin inhibition of the classical pathway.

Key words: complement, blood serum, heparin.