

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.112

©Коллектив авторов

МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФУКОИДАНА НА КОМПЛЕМЕНТ ЧЕЛОВЕКА

Л.В.Галевская¹, Е.В.Рюмина¹, Т.А.Богомаз¹, М.Е.Преображенская²

¹Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова, кафедра биохимии, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого 6/8; тел.: (812)238-70-09; факс:(812)234-01-25; эл. почта: galebskaya@spmu.rssi.ru

²НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул. 10.

Исследовано влияние сульфатированного полисахарида фукоидана на комплемент сыворотки крови человека. В классическом пути активации комплемента наблюдали ингибирование процесса фукоиданом, вплоть до полного прекращения комплемент-зависимого гемолиза при концентрациях фукоидана, превышающих 200-250 мкг на 1 мл сыворотки крови человека. Торможение классического пути, вероятнее всего, было обусловлено связыванием субкомпонента C1q. В альтернативном пути активации комплемента также отмечено ингибирующее действие фукоидана, проявляющееся, в первую очередь, увеличением индукционного периода комплемент-зависимого гемолиза. Мишенью полисахарида является фактор D, часть которого (менее 30%) сохраняет свою активность даже при концентрациях полисахарида, порядка 600 мкг/мл. Описанные свойства фукоидана могут быть использованы для защиты клеток от повреждения собственным комплементом.

Ключевые слова: система комплемента, фукоидан, сыворотка крови человека

ВВЕДЕНИЕ. Система комплемента представляет собой совокупность белков, ответственных за иммунный цитолиз, опсонизацию иммунных комплексов, а также регуляцию активности лейкоцитов и других клеток. Активация системы представляет собой каскад реакций ограниченного протеолиза, в результате которых формируется комплекс мембранной атаки и образуются многочисленные регуляторные пептиды, включая анафилатоксины. При многих заболеваниях, таких как инфаркт миокарда, инсульт, сепсис, ожоги, избыточная активация комплемента поддерживает воспалительный процесс и вызывает повреждение собственных клеток [1 - 3]. В связи с этим ингибирование комплемента способствует уменьшению объема клеточной альтерации и может быть использовано в терапевтических целях. Известно, что сульфатированный полисахарид гепарин способен угнетать систему комплемента [4]. Однако его действие на комплемент оказалось неоднозначным. Во-первых, гепарин проявляет способность к связыванию как компонентов комплемента, так и белков,

ограничивающих этот протеолитический каскад [5]. Во-вторых, результат воздействия гепарина на комплемент варьирует от активации до ингибирования в зависимости от концентрации препарата [6]. Целью настоящего исследования явилась оценка действия другого сульфатированного полисахарида фукоидана на параметры активации комплемента сыворотки крови человека.

МЕТОДИКА. Эксперименты проводили *in vitro*, используя коммерческий препарат фукоидана фирмы "Sigma" (США). Поскольку молекулярная масса используемого препарата фукоидана варьирует от 100 до 150 кДа [7], при расчетах было использовано среднее значение (125 кДа).

Источником активности комплемента являлась сыворотка крови доноров или пациентов клиник СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова. В качестве инициаторов и мишеней для действия комплемента использовали гетерологичные эритроциты. При исследовании классического пути (КПК) активации системы - это были предварительно сенсibilизированные кроличьими антителами эритроциты барана [8], а в качестве инициаторов альтернативного пути (АПК) использовали эритроциты кролика. Эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором и помещали в изотонический вероналовый буфер (рН 7,2). Стандартная взвесь содержала 18 млн. клеток на 1 мл буфера. Показатели активности комплемента определяли кинетическим способом, регистрируя лизис клеток по убыли оптической плотности при 800 нм в термостатированной (37°C) кювете спектрофотометра [9,10].

Оценку влияния фукоидана на комплемент производили, используя следующие показатели состояния системы: время от внесения эритроцитов до наступления гемолиза (величина lag-t) и скорость комплемент-зависимого лизиса эритроцитов (V лизиса) [9]. Для определения влияния фукоидана на активацию комплемента по АПК процесс лизиса эритроцитов кролика регистрировали в присутствии 10 мМ ЭГТА, избирательно блокирующего КПК. Воздействие фукоидана на классический путь без амплификации со стороны АПК 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 [11]. Очищенный препарат фактора D получали по методу Козлова и Солякова [12] в нашей модификации [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Значительная антикомплементная активность фукоидана обнаружена в концентрациях от 12 до 600 мкг на 1 мл сыворотки крови человека. При исследовании влияния фукоидана на классический путь активации комплемента (в системе донорская сыворотка крови - сенсibilизированные эритроциты барана) обнаружено дозозависимое увеличение индукционного периода, сочетающееся с уменьшением скорости комплемент-зависимого гемолиза. Была отмечена высокая степень отрицательной корреляции ($r = -0,77$, $n=15$) изменения параметров lag-t и скорости гемолиза в присутствии различных концентраций фукоидана. На рисунке 1 представлена зависимость остаточной активности КПК (рассчитанной по уменьшению скорости гемолиза) от концентрации фукоидана. Степень угнетения фукоиданом КПК не зависела от количества добавляемых клеток - мишеней и начальной активности системы. Кинетический анализ выявил неконкурентный характер воздействия фукоидана на комплемент. Константа ингибирования, рассчитанная для фукоидана с молекулярной массой 125 кДа, составила $1,50 \pm 0,17$ мкМ ($n=15$), что свидетельствует о достаточно высокой специфичности связывания фукоидана с каким-либо белком (или белками) КПК. При использовании в качестве источника комплемента реагента RD, т.е. сыворотки крови, лишенной фактора D альтернативного пути активации комплемента, были получены такие же данные, как и с интактной сывороткой, величина K_i составила 1,7 мкМ.

Исследование зависимости скорости комплемент-зависимого гемолиза по КПК от концентрации фукоидана не выявило какого-либо порога ингибирующего

ДЕЙСТВИЯ ФУКОИДАНА НА КОМПЛЕМЕНТ

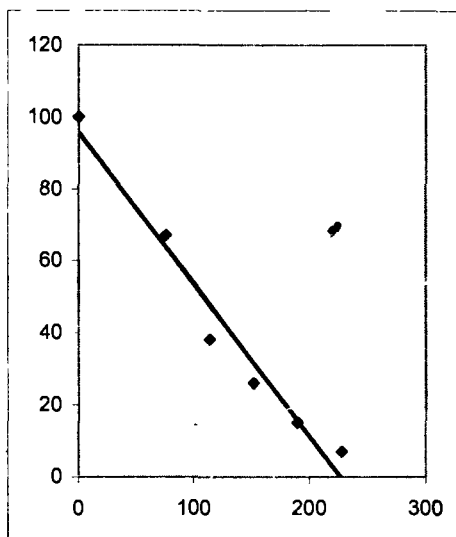


Рисунок 1.

Зависимость средней остаточной активности КПК (в % к контролю) от концентрации фукоидана. По оси абсцисс - концентрация фукоидана в мкг/мл; по оси ординат - % остаточной активности по отношению к контролю.

действия препарата. Это свидетельствует о воздействии фукоидана на ключевое звено каскада классического пути. По литературным данным, лимитирующим звеном в классическом пути активации комплемента является компонент C1 [14]. Протеиназа C1 образуется в результате ассоциации (в ответ на появление комплекса антиген-антитело) субкомпонента C1q с тетрамером $C1s_2C1r_2$, за которой следует протеолитическая аутоактивация фермента. Известно, что субкомпонент C1q, являясь щелочным белком ($pI = 10,6$), обладает высоким сродством к полианионам [15]. Вероятно, именно C1q является мишенью для действия фукоидана. Содержание C1q в сыворотке крови человека составляет в среднем 170 мкМ. По нашим данным, увеличение концентрации фукоидана до 2 мкМ и более приводило к полному блокированию КПК во всех исследованных пробах крови. Таким образом, в условиях полного блокирования КПК на одну небольшую молекулу фукоидана (125 кДа) приходится около ста крупных молекул C1q (460 кДа). По данным электронной микроскопии, пространственная организация C1q напоминает букет из шести тюльпанов. Сродством к анионам обладают так называемые "головки тюльпанов". Вероятно, связывание этих головок нитями фукоидана препятствует сорбции тетрамера на стержневидной части молекулы, а значит и активации КПК.

Из литературы известно, что помимо участия в каскаде комплемента субкомпонент C1q выступает в роли лиганда C1q-рецепторов ряда клеток, в том числе и полиморфноядерных лейкоцитов [16]. Взаимодействие C1q с рецептором приводит к активации фагоцитоза, т.е. стимуляции воспалительного процесса. Можно предположить, что описанное в литературе противовоспалительное действие фукоидана опосредовано не только его взаимодействием с селектинами лейкоцитов и эндотелиальных клеток [17 - 19], но и способностью полисахарида блокировать провоспалительное действие C1q.

При исследовании альтернативного пути активации комплемента наблюдалось дозозависимое увеличение под действием фукоидана индукционного периода; скорость комплемент-зависимого гемолиза не снижалась до достижения определенной пороговой концентрации полисахарида (рис. 2). Как нами было показано ранее [20], величина индукционного периода в АПК находится в обратной зависимости от концентрации фактора D, а скорость гемолиза может снижаться только после уменьшения содержания фактора, ниже некоторого

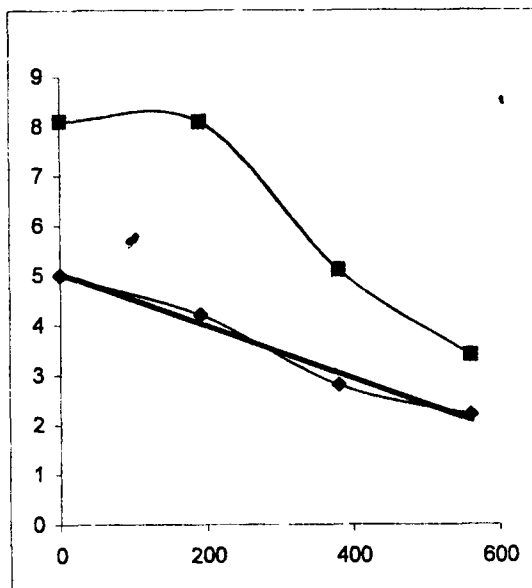


Рисунок 2.

Зависимость параметров активации комплемента по АПК от концентрации фукоидана. По оси абсцисс - концентрация фукоидана в мкг/мл. Верхняя кривая - V лизиса в млн. эритроцитов за 1 мин, нижняя кривая - $1/\text{lag-t} \times 10^3/\text{сек}$.

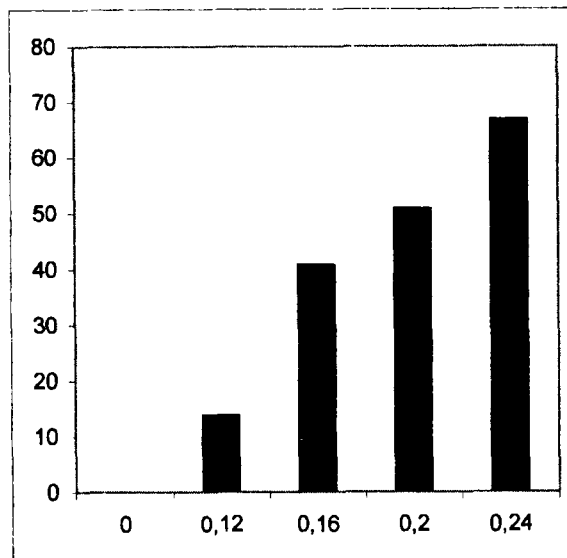


Рисунок 3.

Зависимость степени ингибирования фукоиданом (25 мкг/мл) альтернативного пути активации комплемента (по увеличению lag-t) от концентрации фактора D. По оси абсцисс - концентрация фактора D в мкг/мл; по оси ординат - степень ингибирования в %.

критического уровня. Такой характер влияния на параметры АПК свидетельствует в пользу того, что торможение фукоиданом этого пути обусловлено ингибированием фактора D. Для выяснения механизма действия полисахарида на АПК нами была создана модельная система, состоящая из реагента, дефицитного по фактору D (RD) и очищенного фактора D. Были подобраны такие концентрации фактора D, при которых не только lag-период, но и скорость гемолиза лимитировались его количеством. Результаты представлены на рисунке 3. Из данных рисунка видно, что степень ингибирования комплемент-зависимого

ДЕЙСТВИЯ ФУКОИДАНА НА КОМПЛЕМЕНТ

гемолиза была тем большей, чем выше была концентрация фактора D в инкубационной смеси. При низком уровне фактора D (менее 30% от среднего уровня) ингибирования практически не происходило. Исследование зависимости степени ингибирования фактора D от концентрации фукоидана показало, что полисахарид даже в максимальных из исследованных концентраций не угнетал фактор D полностью. Полученные результаты свидетельствуют о том, что некоторая часть фактора D (менее 30%) оказалась устойчивой к действию фукоидана. Возможно, устойчивость к действию фукоидана фактора D обусловлена его комплексированием с каким-либо компонентом сыворотки крови. В литературе описано изменение электрофоретической подвижности фактора D (β на α) при помещении его в сыворотку крови [21]. Фактор, изменяющий электрофоретическую подвижность фактора D, был описан как компонент фракции псевдоглобулинов, не участвующий в каскаде комплемента. Этот белок до сих пор не идентифицирован.

ВЫВОДЫ. По сочетанию антикоагулянтных и антикомплементных свойств фукоидан напоминает широко применяемый в медицине гепарин. Однако действие фукоидана на комплемент более однозначно. В классическом пути степень ингибирования комплемента фукоиданом прямо пропорциональна его концентрации вплоть до полной инактивации системы. Зависимость же параметров активации КПК от концентрации гепарина носит более сложный характер, что вероятно, отражает многообразие его взаимодействий [6]. В альтернативном пути фукоидан оказывает однозначно ингибирующий эффект, а действие гепарина двухфазно: от активации в низких концентрациях до ингибирования - в более высоких.

Охарактеризованный нами в настоящей работе процесс ингибирования фукоиданом системы комплемента на самых ранних этапах ее активации может быть использован для направленной регуляции активности системы при физиологических и патологических состояниях человека.

Работа частично выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ грант № 01-04-48401).

ЛИТЕРАТУРА

1. Yasuda M., Takeuchi K., Hiruma M. et al. (1990) *Circulation*, **81**, 156-163.
2. Huang J., Kim L.J., Mealey R. et al. (1999) *Science*, **285**, 595-599.
3. Arnaout M.A. (1990) *Blood*, **75**, 1037-1050.
4. Бычков С.Н. (1981) *Вопр. мед. химии*, **27**, 726-736.
5. Sahu A., Pangburn M.K. (1993) *Mol. Immunol.*, **30**, 679-684.
6. Галевская Л.В., Соловцова И.Л., Рюмина Е.В. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 91-97.
7. Durig J., Bruhn T., Zurborn K.H., Gutensohn K., Bruhn H.D., Beress L. (1997) *Thromb. Res.*, **85**, 479-491.
8. Кэбот Е., Майер М. (1968) *Экспериментальная иммунохимия*. М. "Мир", с.156-157.
9. Галевская Л.В., Рюмина Е.В. (1999) *Биохимия системы комплемента*. СПб. Изд-во СПбГМУ.
10. Халятин Б.Д., Прокопьев А.А. (1986) *Иммунология*, **3**, 66-69.
11. Соляков Л.С., Козлов Л.В. (1983) *Биоорг. химия*, **9**, 462-469.
12. Козлов Л.В., Соляков Л.С. (1982) *Биоорг. химия*, **8**, 342-348.
13. Галевская Л.В., Щербак И.Г., Бельтюков П.П., Рюмина Е.В., Соловцова И.Л. (1993) *Биохимия*, **58**, 1796-1800.
14. Nielsen H.E., Larsen S.D., Vikigsdottir T. (1992) *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, **100**, 1053-1060.

15. Reid K.B., Bentley D.R., Wood K.J. (1984) Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci., **306**, 345-354.
16. Jack R.M., Lowenstein B.A., Nicholson-Weller A. (1994) J. Immunol., **153**, 262-269.
17. Shimaoka M., Ikeda M., Iida T., Taenaka N., Yoshiya I., Honda T. (1996) Am. J. Respir. Crit. Care Med., **153**, 307-311.
18. Preobrazhenskaya M.E., Berman A.E., Mikhailov V.I., Ushakova N.A., Mazurov A.V., Semenov A.V., Usov A.I., Nifant'ev N.E., Bovin N.V. (1997) Biochem. Mol. Biol. Int., **43**, 443-451.
19. Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Нифантьев Н.Е., Усов А.И., Почечуева Т.В., Галанина О.В., Бовин Н.В. (1999) Вопр. мед. химии, **45**, 375-384.
20. Галебская Л.В. (1998) Вопр. мед. химии, **44**, 501-505.
21. Konno T., Katsuno Y., Hirai H. (1978) J. Immunol. Meth., **21**, 325-334.

Поступила 29.04.2003

THE MECHANISM OF FUCOIDAN ACTION ON HUMAN COMPLEMENT

¹L.V.Galebskaya¹, E.V.Ryumina¹, T.A.Bogomaz¹, M.E.Preobrazhenskaya²

¹Saint-Petersburg Pavlov Medical University, 6/8 Lev Tolstoy Street, 197022, Saint-Petersburg, Russia;
tel.: (812)238-70-09, fax: (812)234-01-25, e-mail: galebskaya@spmu.rssi.ru

²Orekchovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS,
Pogodinskaya St. 10, Moscow, 119121 Russia.

The action of fucoidan (a sulfated polysaccharide) on human serum complement has been under study. Fucoidan inhibited the classical pathway of complement activation up to the complete arrest of the complement-dependent hemolysis achieved at the polysaccharide concentration higher than 200-250 mg per 1 ml of human serum. The classical pathway inhibition by fucoidan seems to be due to the binding to subcomponent C1q. In the alternative pathway, fucoidan also showed an inhibitory effect seen first in dose-dependent elongation of the lag-period preceding complement-dependent hemolysis. Experimental data suggest that fucoidan target is complement factor D, some part of the which (less than 30%) remains stable to the polysaccharide concentration as high as 600 mg/ml. The fucoidan properties described in this study can be used for cell protection against self-activated complement.

Key words: complement system, fucoidan, human blood serum