

УДК 577.112

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО КАСКАДА КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ЛАЗЕРНОГО ЛУЧА

Л.В. Галебская, Л.А. Андреева, И.Л. Соловцова, М.А. Соловьева, Н.Н. Петрищев*

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, тел.: (812)499-70-09; факс: (812)234-01-25;
эл. почта: galebskaya@spmu.rssi.ru

Пробы сыворотки крови человека подвергали лазерному облучению ($\lambda=633$ нм, $P=13$ мВт, $t=20$ мин) *in vitro*. В опытных и контрольных (инкубированных в темноте) пробах регистрировали показатели гемолитической активности системы комплемента. Лазерное облучение не оказывало заметного влияния на индукционный период и скорость комплемент-зависимого гемолиза по классическому и альтернативному путям; оно также не изменяло функциональной активности фактора В, компонентов С2 и С3. Вместе с тем, действие лазерного облучения сыворотки крови проявилось в значительном снижении коэффициента реактивного лизиса. Обнаруженный факт может в некоторой степени объяснить терапевтический эффект лазерного облучения крови.

Ключевые слова: комплемент, лазерное облучение, сыворотка крови.

ВВЕДЕНИЕ. Система комплемента представляет собой совокупность белков плазмы крови, основным предназначением которой является лизис чужеродных клеток. При активации системы происходят каскады реакций ограниченного протеолиза (классический и/или альтернативный) и формируется комплекс мембранной атаки, способный внедряться и повреждать клетку-мишень. Компоненты комплемента - это белки с максимумом поглощения при 260-280 нм; они не являются акцепторами красного лазерного луча, но могут подвергнуться окислительной модификации [1, 2], инициированной облучением. Целью настоящей работы явился поиск свидетельств воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в отношении системы комплемента человека *in vitro*.

МЕТОДИКА. Объектом исследования служила сыворотка крови человека. Пробу сыворотки (0,5 мл) помещали в стеклянный стаканчик и облучали ее светом гелий-неонового лазера ШАТЛ-1 ($\lambda=633$ нм, $P=13$ мВт) в течение 20 минут. В облученной и контрольной (инкубированной в темноте) пробах сыворотки определяли показатели активности комплемента в условиях активации системы по классическому (КПК) и альтернативному (АПК) путям [3]. Для регистрации комплемент-зависимого гемолиза по КПК в кювету спектрофотометра, термостатированную при 37°C, добавляли 0,1 мл сыворотки крови, 0,4 мл изотонического медианового буфера (рН 7,4) и 0,2 мл физиологического

* - адресат для переписки

ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ЛУЧА НА КОМПЛЕМЕНТ ЧЕЛОВЕКА

раствора. После прогревания инкубационной смеси в течение 3 минут в нее добавляли 0,1 мл стандартной взвеси предварительно отмытых эритроцитов кролика. Оптическая плотность при 800 нм стандартной взвеси эритроцитов, разведенной в 8 раз, составляла $0,560 \pm 0,010$. Для определения активности АПК вместо миналового буфера добавляли 0,4 мл ЭГТА-буфера (5 мМ миналовый буфер, содержащий 10 мМ $MgCl_2$ и 5 мМ этиленгликоль – β , β' -аминоэтиловый эфир N, N, N', N' тетрауксусной кислоты тетранатриевую соль; pH 7,4). После добавления в инкубационную смесь эритроцитов регистрировали динамику снижения оптической плотности при 800 нм через 5 с интервалы. По полученным гемолитическим кривым определяли параметры активности комплемента, а именно индукционный период гемолиза (lag t) или время от внесения эритроцитов до начала гемолиза и скорость лизиса эритроцитов (V_h) как тангенс угла наклона гемолитической кривой.

Исследование влияния лазерного облучения на гемолитическую активность отдельных компонентов комплемента проводили методом реагентов [4]. Метод основан на использовании реагентов, полученных из донорских проб сыворотки крови после избирательной инактивации в них отдельных компонентов комплемента. Пулы донорских сывороток, дефицитных по отдельным компонентам комплемента, носят название реагентов и обозначаются следующим образом: RC2B - реагент на компонент C2 и фактор B, RC3C4 - реагент на компоненты C3 и C4. Исследуемую облученную или контрольную сыворотку в лимитирующих количествах (0,02 или 0,04 мл) использовали в качестве источника недостающего в реагенте компонента. После добавления исследуемой сыворотки в соответствующий реагент регистрировали комплемент-зависимый гемолиз и определяли его параметры, которые были пропорциональны количеству функционально активного компонента. Реагент RC2B получали путем прогревания сывороточного пула при 50°C в течение 20 минут. Поскольку термообработка сыворотки крови приводила к инактивации как участника АПК (фактор B), так и компонента КПК C2, реагент не лизировал эритроциты кролика ни в присутствии ЭГТА, ни в его отсутствие. Для приготовления реагента, дефицитного по компонентам C3 и C4, 1 г монометиламина (ММА) растворяли при постоянном перемешивании в 10 мл сывороточного пула. Затем сыворотку инкубировали 60 мин при 37°C. Избыток монометиламина удаляли путем диализа против физиологического раствора при 4°C в течение 24 часов. Обработка сыворотки монометиламином приводит к разрушению внутренней тиоэфирной связи в компонентах C3 и C4, что сопровождается полной их инактивацией. Реагент RC3C4 не лизировал эритроциты кролика как в присутствии ЭГТА, так и в его отсутствие, так как компонент C3 является участником и АПК, и КПК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Параметры гемолитической активности комплемента человека после лазерного облучения сыворотки крови представлены в таблице 1.

Таблица 1. Показатели активности комплемента сыворотки крови доноров (n=6) после гелий-неонового облучения *in vitro*.

Показатель активности комплемента	Величина показателя после НИЛИ в %% к контролю
lag- t по КПК	95±10
V_h по КПК	111±21
lag- t по АПК	90±27
V_h по АПК	94±10

Из данных таблицы видно, что лазерное облучение не повлияло ни на индукционный период, ни на скорость комплемент-зависимого гемолиза по КПК. Ключевым звеном, определяющим эти параметры, является активность компонента C1 [5]. Таким образом, можно заключить, что компонент C1 не изменяет свои функциональные свойства при лазерном облучении.

В альтернативном пути также не было обнаружено достоверного действия лазерного луча. Имеются данные о том, что в АПК индукционный период и скорость гемолиза являются независимыми величинами [6]. Для индукционного периода была показана лимитирующая роль фактора D [6]. Очевидно, что активность этого фактора не изменялась при облучении. Скорость гемолиза по АПК в разных условиях лимитируется то компонентом C3, то фактором В. Отсутствие изменения Vh по АПК не дает информации о влиянии лазерного облучения на эти компоненты.

По данным литературы, в системе комплемента имеется компонент, чувствительный к действию окислителей. Это - компонент C2, активность которого возрастает после обработки периодатом или другими окислителями [1]. Возможность окислительного действия НИЛИ на компонент C2 была проверена в экспериментах по определению его гемолитической активности. Результаты представлены в таблице 2. В таблице также приведены результаты по определению влияния облучения на компоненты C3 и В.

Таблица 2. Показатели активности отдельных компонентов комплемента до и после гелий-неонового облучения.

Компонент комплемента	lag-t (с)		Vh (млн эр/мин)	
	До НИЛИ	После НИЛИ	До НИЛИ	После НИЛИ
C2 (n=6)	127±25	127±28	10,4±3,9	10,4±4,2
C3 (n=8)	340±41	341±35	4,1±0,6	4,0±0,7
В (n=6)	350±64	426±66	3,0±0,8	3,4±0,9

Обработка данных показала отсутствие влияния облучения на активность компонента C2 (выделено курсивом в таблице 2), а также компонента C3 и фактора В. Таким образом, хотя потенциально C2 может переходить в окисленную активированную форму, в условиях нашего эксперимента этого не происходит.

Итак, мы не обнаружили никаких изменений в функционировании начальных этапов активации комплемента под действием лазерного луча. Заключительная стадия активации системы является общей для КПК и АПК и представляет собой формирование комплекса мембранной атаки и его внедрение в клетку мишень. Этот этап мы оцениваем по обнаруженному нами ранее явлению ускорения (в 1,5-2,5 раза) лизиса повторно добавляемой в инкубационную смесь для определения АПК новой порции эритроцитов кролика [6]. Имеются данные о том, что степень ускорения характеризует описанное в литературе явление реактивного лизиса [7]. Реактивный лизис - это лизис клеток, расположенных вблизи инициаторов комплемента под действием формирующихся на инициаторе комплексов мембранной атаки. Так в нашей системе индуцированные эритроцитами первой порции не полностью сформированные комплексы мембранной атаки C5bC6 могут быть использованы для ускорения лизиса повторной добавленной порции клеток. Эритроциты второй порции при этом выступают и как инициаторы комплемента, и как "жертвы" реактивного лизиса.

ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ЛУЧА НА КОМПЛЕМЕНТ ЧЕЛОВЕКА

Поэтому показателем реактивного лизиса может являться скорость лизиса второй порции эритроцитов - Vh_2 . Однако в этой величине заключен и процесс лизиса клетки собственными комплексами мембранной атаки. Поэтому в большей степени реактивный лизис может быть охарактеризован относительной величиной, которую можно назвать "коэффициент реактивного лизиса" (КРЛ). Величину КРЛ мы рассчитывали по формуле: $(Vh_2 - Vh_1) / Vh_1$, где Vh_1 - это скорость лизиса первой порции эритроцитов. Результаты определения реактивного лизиса до и после облучения сыворотки крови представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели реактивного лизиса эритроцитов до и после лазерного облучения сыворотки крови (n=6).

Показатель реактивного лизиса	До НИЛИ	После НИЛИ
Vh2 по АПК	15,5±3,1	9,3±0,7*
Коэффициент реактивного лизиса	0,98±0,30	0,39±0,20*

Примечание: * - $p < 0,05$.

Видно, что лазерное облучение достоверно снизило оба показателя реактивного лизиса. Величина Vh_2 уменьшилась почти на одну треть, а коэффициент реактивного лизиса снизился более чем в два раза. Этот феномен может быть объяснен описанным в литературе [2] окислением комплекса белков C5 и C6, которое создает условия для превращения его в C5bC6-подобный комплекс. Возможно, этот комплекс из-за более высокой активности внедряется в тень эритроцитов первой порции. В результате на эритроциты второй порции действует меньшее количество комплексов мембранной атаки, и скорость лизиса этой порции снижается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведенное исследование показало, что протеолитические каскады АПК и КПК практически не чувствительны к облучению красным светом. Однако, свойства системы комплемента после НИЛИ, все же, изменяются. Это обнаруживается при регистрации реактивного гемолиза. Оказалось, что в облученных образцах сыворотки крови показатели реактивного гемолиза снизились на 30-60%. Реактивный лизис клеток характерен для многих патологических состояний. Так, например, реактивный лизис в отношении эндотелиоцитов может приводить к тромботическому эффекту [7]. Имеются данные о том, что площадь поражения сердечной мышцы при инфаркте миокарда напрямую зависит от количества в ней комплексов мембранной атаки [8], в том числе попавших в "невинные клетки" механизмом реактивного лизиса. С явлением реактивного лизиса связывают поздние гемолитические осложнения гемотрансфузии [9]. Обнаруженный нами факт ингибирования под действием НИЛИ реактивного лизиса может служить обоснованием лечебного действия лазерного облучения крови. Кроме того, регистрация реактивного гемолиза может быть использована для оценки биологического действия лазерного луча.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thielens N.M., Villers C.N., Villers M.B., Colomb M.G. (1984) FEBS Lett., **165**, 111-116.
2. Vogt W., Hesse D. (1994) Immunology, **192**(1-2), 1-9.
3. Галевская Л.В., Рюмина Е.В., Тарасова Ю.В., Щербак И.Г., Леонтьева Н.В. (2001) Клин. лаб. диагн., №3, 47-49.

4. Соляков Л.С., Козлов Л.В. (1983) Биоорган. химия, **9**, 462-469.
5. Nielsen H.E., Larsen S.D., Vikigsdottir T. (1992) Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., **100**, 1053-1060.
6. Галебская Л.В. (1998) Вопр. мед. химии, **44**(5), 501-505.
7. Hamilton K.K., Hattori R., Esmon C.T., Sims P.G. (1990) J. Biol. Chem., **265**(9), 3809-3814.
8. Homeister J.W., Satoh P., Luochesi B.R. (1992) Circ. Res., **71**(2), 303-319.
9. Green D.L., Khan S. (1993) Immunohematol., **9**(3), 74-77.

Поступила: 06. 06. 2007.

THE STYDY OF THE HUMAN COMPLEMENT CASCADE OF PROTEOLYSIS AS A TARGET OF LASER IRRADIATION

L.V. Galebskaya, L.A. Andreeva, I.L. Solovtsova, M.A. Solov'eva, N.N. Petrishchev

Pavlov St-Peterburg State Medical University, St-Peterburg, tel.: (812)499-70-09; fax: (812)234-01-25;
e-mail: galebskaya@spmu.rssi.ru

Samples of human blood plasma were irradiated with the laser beam ($\lambda=633$ nm, $P=13$ mW, $t=20$ min) *in vitro*. In experimental and control (incubated in the dark) samples the complement hemolytic activity was measured. Laser irradiation had minor influence on the duration of lag-period and the rate of complement-dependent hemolysis via classical and alternative pathways; it also did not alter the functional activity of factor B, components C2 and C3. Nevertheless laser irradiation effect was seen in essential reduction of a bystander lysis coefficient. This new fact can elucidate some aspects of the clinical effectiveness of the blood laser irradiation.

Key words: complement, laser irradiation, blood serum.