

УДК 612.017.1:612.112.31

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ *IN VITRO*

П.П. Бельтюков, Л.В. Галевская, Н.Б. Симкина, Ю.В. Тарасова

*(Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова; e-mail: biochem@spmu.rssi.ru)*

Протеолитическая обработка сыворотки крови панкреатическим калликреином приводит к снижению скорости комплемент-опосредованного гемолиза и уменьшению гемолитической емкости преимущественно по альтернативному пути. В экспериментах с очищенными белками показано, что эти изменения обусловлены расщеплением компонента С3, снижение функциональной гемолитической активности компонента С3 достигается также после его обработки эластазой. С1-ингибитор предотвращает протеолитическое разрушение С3 калликреином, повышая ингибиторный порог.

Система комплемента представляет собой группу действия протеаз при повышении протеолитической белков плазмы крови, которые могут стать объектом активности плазмы крови. Целью настоящего

исследования стало изучение функциональных последствий обработки плазмы крови или очищенного компонента С3 с помощью калликрейна и эластазы.

Материалы и методы

В экспериментах использовали химические реактивы импортного (*Sigma, Fluka*) или отечественного производства, имевшие квалификацию не ниже “ч.д.а”. В ходе очистки белков использовали гели для хроматографии (“*Amersham Pharmacia Biotech*”).

Смешанную сыворотку крови, полученную из крови здоровых доноров обоих полов в возрасте от 20 до 45 лет использовали в качестве источника для получения компонента С3, а также для приготовления реагента RC3 (сыворотка, дефицитная по компоненту С3).

Выделение С3 из сыворотки крови проводили по методу [1] с небольшими модификациями. Для приготовления реагента RC3 сыворотку крови обрабатывали монометиламином при температуре 37° в течение 1 ч (до установления концентрации 10%) с последующим диализом против изотонического раствора хлорида натрия при ~4° в течение ~12 ч [1]. Протеолитическую обработку проводили путем инкубации сыворотки крови или компонента С3 с разным количеством калликрейна или эластазы. Остаточную активность С3 в очищенном препарате или в сыворотке крови измеряли с помощью кинетической фотометрической регистрации [2] гемолитической активности в системе RC3–С3. В состав инкубационной смеси входили: 0,2 мл RC3; 0,2 мл VBS-Mg; Ca-буфер (VBS++ – 0,05 М мединаловый буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 0,15 мМ CaCl₂ и 0,5 мМ MgCl₂); компонент С3 или разведенную сыворотку крови в субгемолитических концентрациях (т.е. в количествах, которые сами по себе не вызывают комплемент-опосредованного гемолиза без добавления реагента RC3). Общий объем инкубационной смеси доводили до 0,7 мл 0,9%-м раствором хлорида натрия. После инкубации смеси ($t = 3$ мин, $T = 37^\circ$) добавляли 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов ($E_{800} = 1,2 \times 10^7$ мл⁻¹). В качестве объекта для действия комплемента при активации по альтернативному пути использовали эритроциты кролика, а при регистрации процесса активации по классическому пути – сенсibilизированные эритроциты барана.

Гемолиз регистрировали путем измерения оптической плотности в термостатируемой кювете спектрофотометра ($l = 5$ мм, $\lambda = 800$ нм). Скорость гемолиза (V_{lys}) и гемолитическую емкость (ГЕК) использовали в качестве показателей, соответствующих активности и количеству комплемента [3].

В качестве источника панкреатического калликрейна использовали препарат “*Андекалин*” (*Белмедпрепарат*, Минск). Коммерческий препарат подвергали дополнительной очистке с помощью ионообменной хроматографии на колонке (1,2×10 см), заполненной

ДЕАЕ-52-целлюлозой и уравновешенной 0,05 М фосфатным буфером. Элюцию белков, связавшихся с ионообменником, проводили линейным градиентом хлорида натрия (от 0 до 0,5 М). В последнем из полученных белковых пиков находился очищенный калликреин, не содержащий примесей. Наличие калликрейна в препарате и его активность определяли по гидролизу α -*N*-бензоил-*L*-аргинин этилового эфира (БАЭЭ).

Бычьей панкреатической эластазу получали из препарата “*Эластолитин*” (“*Самсон*”, Санкт-Петербург) путем дополнительной очистки методом ионообменной хроматографии на СМ-Сефадексе С-50 (колонка 0,8×4 см), уравновешенном 0,05 М Трис-НСl буфером (рН 8,8). Элюцию связавшихся белков проводили линейным градиентом NaCl от 0 до 0,15 М. Активность эластазы определяли фотометрически, используя в качестве субстрата Эластин-Конго Рот. В экспериментах использовали только те фракции, которые обладали эластолитической активностью и не проявляли гидролитической активности в отношении *N*-бензоил-*DL*-аргинин *p*-нитроанилида (БАПНА).

Из плазмы крови С1-ингибитор получали по методу [4], включающему преципитацию в присутствии ПЭГ-6000 (*Fluka*), ионообменную хроматографию на *ДЕАЕ-52-целлюлозе* и аффинную хроматографию на *Конканавалин А-Сефарозе*. В качестве дополнительного этапа очистки использовали гель-фильтрацию на *Сефакриле S-200* (колонка 1,6×30 см, Трис-НСl буфер (0,02 М, рН 8,0) в присутствии 0,24 М NaCl). Элюат, полученный после аффинной хроматографии, концентрировали с помощью метода ультрафильтрации до установления объема 3 мл и наносили на колонку с *Сефакрилом S-200* со скоростью около 10 мл/ч. Полученный таким способом С1-ингибитор был электрофоретически гомогенным.

Результаты и их обсуждение

Обработка сыворотки крови (0,1 мл) калликрейном в количестве, не превышающем 50 мг (0,34 мюнит/мкг), в течение 10 мин при 37° не приводила к устойчивому изменению параметров комплемент-опосредованного гемолиза сенсibilизированных эритроцитов барана по классическому пути в присутствии VBS⁺⁺. В то же время скорость гемолиза и ГЕК при активации комплемента по альтернативному пути (в присутствии эритроцитов кролика) существенно снижались в результате такой обработки (таблица).

Поэтому в дальнейших экспериментах мы исследовали действие панкреатического калликрейна на альтернативный путь активации комплемента в присутствии эритроцитов кролика и реагента RC3.

Изменение параметров функциональной активности С3 после обработки сыворотки или очищенного компонента С3 было исследовано в присутствии и в отсутствие С1-ингибитора. В экспериментах в гемолитической

Т а б л и ц а 1

**Влияние панкреатического калликреина на кинетические параметры
комплемент-опосредованного гемолиза**

V_{lys}			Гемолитическая емкость		
Общая	по КПК	по АПК	Общая	по КПК	по АПК
93,5 ± 4,6	94,8 ± 6,3	5,8 ± 3,5*	53,6 ± 6,4*	93,8 ± 3,5	21,2 ± 5,4*

Примечание. (0,1 мл сыворотки крови, обработка калликреином: 50 мкг, 10 мин, 37°). Результаты выражены в процентах к контролю (необработанная сыворотка), $n=6$; * $p<0,05$.

системе RC3–С3 были созданы условия с лимитирующими концентрациями С3. Таким образом, скорость комплемент-опосредованного лизиса находилась в прямой зависимости от концентрации С3 в смеси.

Известно, что зависимость скорости комплемент-опосредованного лизиса эритроцитов кролика по альтернативному пути от содержания С3 при концентрациях, близких к физиологическим, имеет нелинейный характер [5]. Поэтому в наших экспериментах были использованы только такие концентрации, которые соответствуют начальному (линейному) участку этой зависимости. Данные экспериментов по влиянию калликреина на функциональную активность С3 после преинкубации калликреина с очищенным компонентом С3

приведены на рис. 1, 2. Обработка С3 калликреином ведет к дозозависимому снижению функциональной активности комплемента вплоть до полного угнетения при концентрации калликреина 6,0–6,5 мкг/мл (около 2,5 мюнит/мл по БАЭЭ-гидролазной активности). Преинкубация калликреина с С1-ингибитором в концентрациях, приближенных к физиологическим, дозозависимо снижает действие калликреина на систему комплемента. После преинкубации 100 мкг С1-ингибитора с 6,75 мкг калликреина (в объеме 0,3 мл; 10 мин; 37°) его способность влиять на функциональную активность комплемента полностью подавлялась.

Снижение гемолитической активности компонента С3 в присутствии калликреина и предотвращение этого эффекта в результате обработки калликреина С1-ингибитором позволяют утверждать, что разрушение С3 в результате протеолитического действия калликреина может происходить в условиях, близких к физиологическим, и в особенности при патологии, сопровождающейся повышением общей протеолитической активности крови.

В экспериментах с разведенной сывороткой преинкубация калликреина не приводила к существенному снижению скорости комплемент-опосредованного гемолиза вплоть до достижения значительной концентрации протеиназы. Такая зависимость связана с содержанием эндогенных ингибиторов протеиназ в сыворотке крови, в том числе и С1-ингибитора – одного из потенциальных ингибиторов калликреина [6]. Ингибиторный порог для действия калликреина на С3 в сыворотке был определен в экспериментах с разведенной сывороткой ($n = 10$) и составил около 250 мкг (около 85 мюнит) в расчете на 1 мл сыворотки крови (рис. 3). Следует обратить внимание на то, что активность калликреина в опытах не превышала 100 мюнит/мл, т.е. соответствовала такой активности калликреина, какая наблюдается в крови при некоторых патологических состояниях [7].

Добавление очищенного С1-ингибитора к сыворотке, как и следовало ожидать, приводило к увеличению ингибиторного порога, что подтверждает роль С1-ингибитора

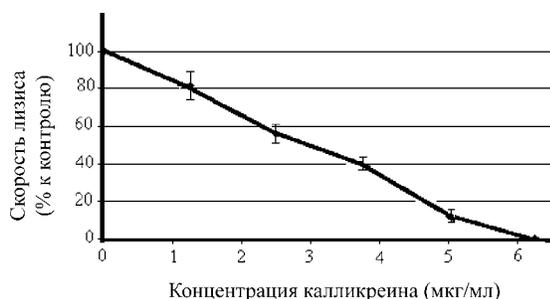


Рис. 1. Изменение скорости лизиса эритроцитов кролика в гемолитической системе RC3–С3 после обработки очищенного С3 калликреином. Концентрация С3 до обработки 0,4 мг/мл, объем RC3 0,2 мл, общий объем смеси 0,6 мл ($n = 6$)

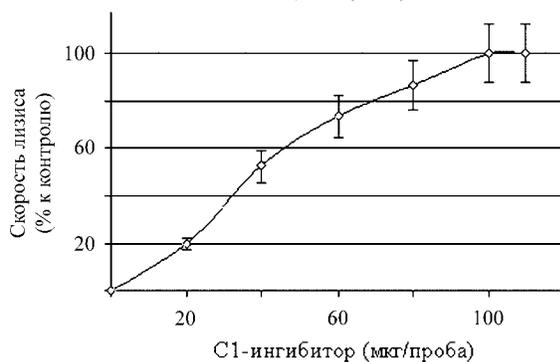


Рис. 2. Зависимость скорости комплемент-опосредованного лизиса эритроцитов кролика в системе RC3–С3 в присутствии калликреина, обработанного С1-ингибитором, от концентрации С1-ингибитора

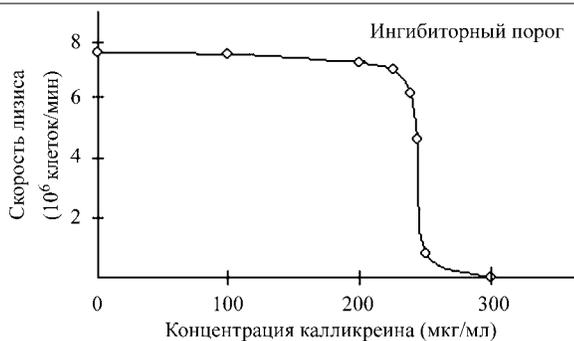


Рис. 3. Ингибиторный порог для действия панкреатического калликреина на комплемент-опосредованный лизис эритроцитов кролика в системе RC3–C3 (в качестве источника C3 использована разведенная сыворотка крови)

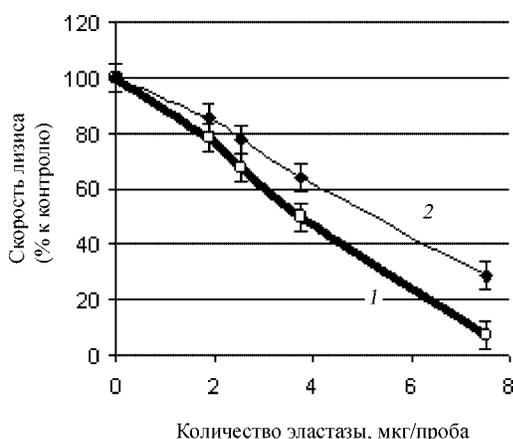


Рис. 4. Изменения комплемент-опосредованного лизиса эритроцитов кролика в системе RC3–C3 после обработки компонента C3 (0,4 мг/мл) панкреатической эластазой в отсутствие и в присутствии соевого ингибитора трипсина (0,25 мг/мл)

как одного из важных регуляторов активности калликреина в крови.

Воспалительные процессы в поджелудочной железе сопровождаются повышением активности различных протеолитических ферментов, в том числе эластазы.

Считается, что даже при острых панкреатитах практически вся панкреатическая эластаза находится в крови в составе комплекса с α -1-протеиназным ингибитором [8]. Однако развитие воспалительных реакций нередко сопровождается дегрануляцией полиморфоядерных лейкоцитов [9]. Это может привести к освобождению большого количества лейкоцитарной эластазы, обладающей сходной субстратной специфичностью.

В первичной структуре компонента C3 имеются последовательности аминокислот, пригодные для протеолитического действия эластазы. Поэтому компонент C3 при определенных условиях может рассматриваться как потенциальный субстрат для действия эластазы. В экспериментах по изучению действия эластазы преинкубацию C3 (0,4 мг/мл) или разведенной сыворотки крови (концентрация C3 около 0,2 мг/мл) с очищенным препаратом эластазы (до 30 мкг/мл) проводили в течение 4 мин при температуре 20°. Было выявлено, что даже такая непродолжительная инкубация очищенного C3 или разведенной сыворотки крови приводит к значительному снижению его гемолитической активности, регистрируемой в системе RC3–C3 (рис. 4). Во всех экспериментах ($n = 10$) было зарегистрировано снижение скорости комплемент-опосредованного гемолиза. Наблюдавшийся эффект зависел от концентрации ингибитора и от времени его воздействия.

Таким образом, нами показано, что панкреатический (тканевой) калликреин эффективно гидролизует компонент C3 комплемента человека в условиях, близких к физиологическим. Результатом этого становится угнетение комплемент-опосредованного гемолиза по альтернативному пути активации комплемента, а также снижение гемолитической емкости комплемента; С1-ингибитор обладает способностью предотвращать действие калликреина на C3 и повышает величину ингибиторного порога для действия калликреина. Компонент C3 комплемента является одним из наиболее уязвимых для действия панкреатической эластазы белков плазмы крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Л.В., Шибанова Е.Д., Зинченко А.А. // Биохимия. 1987. 52. С. 660.
2. Халятин Б.Д., Прокопьев А.А. // Иммунология. 1986. № 3. С. 66.
3. Галебская Л.В. // Вопр. мед. химии. 1998. 44. С. 501.
4. Reboul A., Arlaud G.J., Sim R.B., Colomb M.G. // FEBS Lett. 1977. 79. P. 45.
5. Рюмина Е.В. // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1992.
6. Kirschfink M., Nurnberger W. // Mol. Immunology. 1999. 36. P. 225.
7. Дзизинский А.А., Гомазков О.А. // Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Новосибирск, 1976.
8. Hakansson H.O., Borgstrom A., Ohlsson K. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1993. 53. P. 17.
9. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Ругнес Э. и др. // Вопр. мед. хим. 2001. 47. С. 55.

Поступила в редакцию 25.10.02