

4. Дранник Г. Н., Ена Я. М., Варецкая Т. В. Продукты расщепления фибрина / фибриногена при патологических процессах.— Киев: Здоров'я, 1987.— 182 с.
5. Ена Я. М., Виноградова Г. Н., Свигальская Л. А., Глуценко И. В. Определение содержания фибриногена в плазме крови // Лаб. дело.— 1983.— № 8.— С. 31—33.
6. Кацадзе Ю. Л., Котовицкова М. А. Определение активности комплекса антитромбин III—гепарин в плазме крови // Там же.— 1982.— № 4.— С. 232—234.
7. Клиническая гематология / Под ред. Шт. Берчану.— Бухарест: Мед. изд-во, 1985.— 1221 с.
8. Коноплева Л. Ф., Карпенко В. В., Ена Я. М., Сушко Е. А. Плазмаферез в сочетании с гемосорбцией в лечении больных гипертонической болезнью // Врачеб. дело.— 1991.— № 7.— С. 32—34.
9. Нарушение реакций образования тромбина / Под ред. Коллин Р. У.— М.: Медицина, 1988.— 220 с.
10. Петик А. В., Шмалько Ю. П., Соловьев Д. А. Влияние снижения уровня фибриногена в крови мышей при метастазировании карциномы Льюис // Эксперим. онкология.— 1991.— 13, № 5.— С. 68—69.
11. Угарова Т. П., Соловьев Д. А., Золотухин В. А. и др. Выделение тромбиноподобных ферментов из яда змей рода *Agkistrodon* // Тез. докл. конф. «Методы получения и анализа биохимических реактивов» (окт. 1987 г., Рига).— Рига, 1987.— С. 122.
12. Cook N. S., Ubben D. Fibrinogen as a major risk-factor in cardiovascular disease // *TiPS*.— 1990.— 11.— P. 444—451.
13. Dessi G., Enna P. Increased plasma fibrinogen in patients with acute ischemic stroke or TIA // *Epidem. Athero Scler. Satell. Meet. Porte, Cervo, Oct. 14—15, 1988.*— Roma, 1988.— P. 181—186.
14. Esnouf M., Tunnach G. The isolation and properties of the thrombin—like activity from *Agkistrodon rhodostoma* venom // *Brit. J. Haematol.*— 1967.— 13.— P. 581—590.
15. Heilstern P., Oberfrank K., Kohler M. et al. Die aktivierte partielle Tromboplastinzeit (APTT) als Screeningtest für leichte Gerinnungsfaktorenmangel. Untersuchungen zur Sensitivität von verschiedenen Reagenzien // *Lab. Med.*— 1989.— Bd. 13, N 3.— S. 83—86.
16. Ziemer S., Hoesler E., Monike A. Therapeutic plasmaferesis and haemostatic system // *Folia Haematol.*— 1988.— 115, N 4.— P. 563—568.

Ин-т біохімії ім. О. В. Палладіна
АН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 11.09.92

УДК 612.11+612.42+612.014

И. П. Кайдашев, А. В. Катрушов, В. П. Мищенко

Влияние ферментативной обработки мембран эритроцитов на их взаимодействие с нейтрофильными лейкоцитами

Вивчено вплив обробки еритроцитів різними ферментами (нейтрамінідазою, трипсином і папаїном) на ліпідну пероксидацію в їх мембранах, активність антиоксидантних ферментів і здатність таких еритроцитів взаємодіяти з нейтрофільними лейкоцитами. Показано, що десіалізація мембранних структур еритроцитів веде до посилення ліпідної пероксидації в мембранах, зниженню їх стійкості. Одночасно посилюється взаємодія нейтрофілів та еритроцитів. Обробка протеазами викликає протилежні зміни. Показана можливість відщеплення кінцевих молекул сіалових кислот з оголенням субтермінальних залишків β-галактози, у результаті дії активних форм кисню. Висунуто припущення про функціональне сполучення вільнорадикального окислення й протеоліза в забезпеченні стабільності клітинних мембран.

Введение

Накопилось множество фактов, демонстрирующих, что разные формы реактивности нейтрофилов обеспечивают организму не только состояние неспецифической резистентности, но и поддерживают гомеостаз на

© И. П. КАЙДАШЕВ, А. В. КАТРУШОВ, В. П. МИЩЕНКО, 1993

стабильном уровне. Одной из интереснейших областей биологических знаний являются межклеточные взаимодействия с участием нейтрофильных лейкоцитов. Представляет значительный интерес физиологическая значимость взаимодействия эритроцит — нейтрофил. В предшествующей работе [7] мы привели теоретические предположки и экспериментальные обоснования существования этого взаимодействия и механизмов, лежащих в его основе. Не оставляет сомнений, что в основе механизмов такого взаимодействия лежит перекисная деструкция поверхностных мембранных структур эритроцитов. Однако, остается неясным, какая из структур является ведущей в активации нейтрофилов. Наиболее вероятно существование на эритроците особого рецептора, который либо появляется за период старения (повреждения), либо усиливает свою экспрессию.

Известно, что при старении клеток в их составе уменьшается количество сиаловых кислот и обнажаются субтерминальные остатки β -галактозы макромолекул [17]. В то же время, по данным Goldstein и Hayes [13], на предварительно десилизированных эритроцитах человека обнаруживается структура β -D-Gal-(1-3)-D-Gal-1, которая обозначается как антиген Томпсона — Фриденрейха, способный взаимодействовать с нейтрофилами [11]. По-видимому, удаление объектов с десилизированными молекулами β -галактозы является весьма распространенным в организме процессом, так как и макрофаги способны захватывать такие объекты [16]. Эти реакции проходят с участием галактозоспецифичных лектинов, локализованных на клетках ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС) [17, 18].

Однако, не вполне ясно, под действием каких агентов происходит отщепление концевых остатков сиаловых кислот от структур в организме. По нашему мнению, наиболее вероятной может являться деструкция сиалосодержащих гликопротеидов под действием активных форм кислорода.

Методика

Опыты проводили на самцах гвинейских свинок массой 350—400 г., у которых под барбитуровым наркозом забирали кровь из правого предсердия. Из крови, стабилизированной гепарином, выделяли фракцию нейтрофилов в градиенте плотности фикола — урографин [9] и эритроциты. После отмывки эритроцитов раствором NaCl (0,15 моль/л), их обрабатывали в течение 60 мин при 37 °C нейраминидазой (0,05 мг/мл), трипсином (1 мг/мл) и папаином (1 мг/мл), смешивая их с суспензией эритроцитов в соотношении 1:2. После чего эритроциты трижды отмывали раствором NaCl и в соотношении 470:1 смешивали с собственными нейтрофилами. Контролем служили интактные отмывые эритроциты того же животного. После 60 мин инкубации смеси при 37 °C изучали относительное (%) накопление в мембранах эритроцитов малнового диальдегида (МДА) в ходе 1,5-часовой инкубации [4], спонтанный гемолиз эритроцитов (СГЭ) [14], активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) [3] и каталазы [1], одновременно для определения интенсивности кислородзависимого метаболизма нейтрофилов в смеси эритроциты — нейтрофилы определяли спонтанную хемилюминесценцию на β -счетчике «БЕТА» отечественного производства.

В следующей серии опытов исследовали, как воздействие активными формами кислорода влияет на содержание сиаловых кислот на поверхности эритроцитов. Отмывые эритроциты помещали в изотоническую железно-аскорбатную систему [4] и инкубировали при 37 °C. Содержание сиаловых кислот в надосадочной жидкости определяли по Гессу до инкубации, через 15 и 60 мин после инкубации. Профиль гликопротеидов эритроцитов изучали методом агглютинации с лектинами арахиса, зародышей пшеницы и коры бузины черной (НПКО «Лектино-

вест») [6]. Учет реакции проводили с помощью балльной оценки (полная агглютинация — 3 балла, неполная — 2, частичная — 1, отсутствие — 0). Результаты обработаны статистически [8].

Результаты и их обсуждение

После ферментативной обработки эритроцитов существенно изменялась интенсивность перекисного окисления липидов в них (табл. 1). После десенсилизации мы отметили увеличение СГЭ, мера которого, по мнению некоторых авторов, отражает меру перекисной резистентности эритроцитов, и увеличения скорости накопления МДА, что свидетельствует об интенсификации липидной перекисидации; активность антиоксидантных ферментов (АОФ) существенно не менялась. Одновременно значительно усиливалась спонтанная хемилюминесценция нейтрофильной суспензии. Известно, что спонтанная хемилюминесценция является одним из интегральных показателей активности фагоцитарных клеток [2, 5]. Основные источники этой хемилюминесценции: гидроксильный радикал, синглетный кислород и компонент, образование которого зависит от радикала супероксиданиона и от перекиси водорода [12].

Обработка эритроцитов протеазами (папаином и трипсином) с последующим контактом с нейтрофилами вызывала снижение скорости накопления МДА, уменьшение СГЭ. Как и при обработке нейраминидазой активность АОФ изменялась мало. Интенсивность хемилюминесценции нейтрофильной суспензии при наличии эритроцитов, обработанных протеазами, существенно снижалась по сравнению с десенсилизированными и достигала контрольных значений. По нашему мнению, полученные результаты показывают, что контакт эритроцитов, подвергшихся ферментативной модификации мембран, приводит к изменению липидной перекисидации мембран, существенно не влияя на активность АОФ — каталазы и СОД. Десенсилизация эритроцитов и последующий контакт с собственными нейтрофилами приводят к дестабилизации эритроцитарных мембран. Обработка протеазами дает обратный эффект. Мы считаем, что обнажение галактозильных субтерминальных остатков после десенсилизации приводит к активации кислородзависимого метаболизма нейтрофилов с усиленной генерацией свободных радикалов, которые вызывают снижение устойчивости эритроцитарных мембран. Обработка протеазами не приводит к демаскированию галактозы, а способствует отщеплению открытых остатков галактозы.

Мы попытались установить, могут ли свободные радикалы вызывать отщепление сиаловых кислот. Как видно из табл. 2, инкубация эритро-

Т а б л и ц а 1. Состояние липидной перекисидации в эритроцитах, подвергшихся ферментативной обработке, и активность нейтрофилов

Исследуемый показатель	Суспензия нейтрофилов с эритроцитами			
	нормальными	десенсилизированными	трипсинизированными	папаинизированными
Относительный прирост содержания малонового диальдегида в суспензии (за 1,5 ч инкубации), % начального	176,0±12,4	360,3±8,0***	106,7±10,8***	136,5±14,1**
Спонтанный гемолиз эритроцитов, %	5,96±0,11	7,28±0,27*	1,72±0,32***	1,20±0,39***
Активность ферментов, усл. ед.:				
каталазы	1,12±0,24	1,27±0,11	1,26±0,21	0,95±0,37
супероксиддисмутазы	1,00±0,08	1,11±0,06	1,11±0,10	0,90±0,09
Частота импульсов хемилюминесценции, мин ⁻¹	27,0±6,2	73,3±9,2*	39,0±4,1	30,4±3,2

* P<0,01; ** P<0,05; *** P<0,001.

цитов при наличии железоаскорбатной системы, генерирующей различные активные формы кислорода, действительно приводит к увеличению свободных сиаловых кислот уже через 15—20 мин после начала воздействия. Через 60 мин количество отщепившихся кислот уменьшается, по-видимому, за счет их сорбции на поверхности эритроцитов.

Таблица 2. Изменение содержания сиаловых кислот в крови и гликопротеидного профиля эритроцитов под действием свободных радикалов

Изучаемый показатель	До инкубации	Через 15 мин инкубации	Через 60 мин инкубации
Концентрация сиаловых кислот, мг/л	32,4±3,8	130,1±9,6*	94,2±10,5*
Агглютинация с лектином арахиса, балл	4,1±0,5	3,1±0,2	—
Агглютинация с лектином зародышей пшеницы, балл	29,0±0,2	32,8±0,1**	—
Агглютинация с лектином коры бузины черной, балл	16,0±0,8	12,1±0,9*	—

* $P < 0,01$; ** $P < 0,001$.

Для уточнения гликопротеидного профиля мембран мы использовали тест специфической гемагглютинации с лектинами арахиса (специфичен к антигену Томпсона — Фриденрейха), зародышей пшеницы (остатки сиаловых кислот), коры бузины черной (остатки галактозы). Согласно работам Roth [15], число мест связывания на поверхности эритроцитов обратно пропорционально мере их агглютинации лектинами. Более точно число мест связывания определяется по методу Скетчарда [10]. Однако метод весьма сложен и трудоемок, поэтому лектинзависимая гемагглютинация в этом случае является методом выбора. Пятнадцатиминутное воздействие активными формами кислорода вызывало незначительное увеличение числа мест связывания для лектина арахиса и большее для лектина коры бузины черной. Число мест связывания для лектина зародышей пшеницы уменьшилось, что свидетельствует о десилизации мембранных структур.

Мы считаем, что старение, включающее в себя десилизацию субтерминальных остатков β -галактозы, может иметь в своей основе постоянное повреждающее воздействие активных форм кислорода на мембранные структуры эритроцитов. Окончательное, решающее воздействие, направленное на разрушение и захват объекта, оказывают нейтрофилы и клетки РЭС. Действие протеаз в этих условиях, возможно, направлено на удаление с поверхности эритроцитов десилизированных структур и увеличение устойчивости мембран в условиях мощных воздействий активными формами кислорода.

Таким образом, открывается новая сторона физиологической роли сиаловых кислот в организме и тесное функциональное сопряжение свободнорадикального окисления и протеолиза.

I. P. Kaidashev, A. V. Katrushev, V. P. Mishchenko

EFFECT OF THE ENZYMATIC TREATMENT OF ERYTHROCYTE MEMBRANES ON THEIR INTERACTION WITH NEUTROPHILIC LEUCOCYTES

The treatment of erythrocytes with different enzymes (neurominidase, trypsin and papain) has been studied for its effect on the lipid peroxidation in their membranes, activity of antioxidant enzymes and on the ability of such erythrocytes to interact with neutrophilic leucocytes. It is shown that desialization of the membrane erythrocyte structures causes the intensification of lipid peroxidation in the membranes, decrease of their stability. Simultaneously, the interaction of neutrophils increases. The treatment with proteases causes the opposite changes. It is shown possible to split out

the end molecules of sialic acids with exposure of the subterminal residues of B-galactose as a result of the effect of active oxygen forms. An assumption is advanced concerning the functional conjugation of the free-radical oxidation and proteolysis in provision of stability of the cell membranes.

Medical Stomatological Institute,
Ministry of Public Health of Ukraine, Poltava

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архипова О. Г. Методы исследования в пропатологии.— М.: Медицина, 1988.— С. 156—157.
2. Барсуков А. Л., Филатов А. В., Васин Ю. А. Хемилуминесцентный анализ фагоцитоза макрофагов.— Иммунология.— 1983.— № 2.— С. 63—66.
3. Брусов О. С., Герасимов А. Н., Панченко Л. Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1976.— № 1.— С. 33.
4. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука.— 1972.— 250 с.
5. Зенков Н. К., Куликов В. Ю. Хемилуминесцентный метод исследования функциональной активности фагоцитарных клеток // Лаб. дело.— 1985.— № 1.— С. 43—45.
6. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д., Лектины.— Львов: Виш. шк. Изд-во Львов. ун-та, 1981.— 156 с.
7. Мищенко В. П., Кайдашев И. П., Катрушов А. В. и др. Влияние нейтрофильных лейкоцитов на состояние липидной пероксидации в эритроцитах и его физиологическое значение // Физиол. журн.— 1990.— 36, № 6.— С. 55—59.
8. Румишинский И. З. Математическая обработка результатов эксперимента.— М.: Наука.— 1971.— С. 25—41.
9. Фримель Г. Иммунологические методы.— М.: Медицина.— 1987.— С. 244—246.
10. Dupuis G., Clairoux-Moreau S. Binding of chemical derivatives of Phaseolus vulgaris phytohemagglutinin to pig spleen lymphocytes // Canad. J. Biochem.— 1980.— 58, N 5.— P. 399—405.
11. Dvorak A. M., Conhel S. B., Proppe R., Dvorak H. F. // J. Immunol.— 1978.— 120.— P. 1240—1248.
12. Ernst M. Chemiluminescence and macrophage activation // Behring. Inst. Mitt. 1981.— N 65.— P. 55—61.
13. Goldstein I., Hayes C. The lectins: carbohydrate—binding proteins of plants and animals // Alv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1978.— 35.— P. 127—340.
14. Jager F. C. Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro // Nutr. Diets.— 1968.— 10, N 3.— P. 215—223.
15. Roth J. The lectins: molecular probes in cell biology and membrane research // Exp. Pathol. (Jena).— 1978.— Suppl. 3.— 186 p.
16. Shauer R., Fischer C., Kluge F. et al. Mechanism of binding and uptake of sialidase-treated blood cells and glycoproteins by the galactose-specific receptor of rats peritoneal macrophages // Biomed. and biochem. Acta.— 1990.— 49, N 2/3.— S. 230—235.
17. Schelepper-Schaffer J., Kolb-Bachofen U., Kolb H. Analysis of lectin dependent recognition of desialylated erythrocytes by Kupfer cells // Biochem. J.— 1980.— 186, N 3.— P. 827—831.
18. Simpson D., Thorne D., Loh H. Lectins: endogenous carbohydratebinding proteins from vertebrates tissues. Functional role in recognition processes? // Life Sci.— 1978.— 22, N 9.— P. 727—748.

Полтав. мед.-стомат. ин-т
М-ва здравоохранения Украины

Материал поступил
в редакцию 27.08.91