

© КУЛЕШИНА О.Н., КОЗЛОВ Л.В., 2014

УДК 616.9-022-092:612.124.017.1]-07

Кулешина О.Н., Козлов Л.В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КОМПОНЕНТОВ И ФАКТОРОВ КОМПЛЕМЕНТА ПО ЕГО ДЕЙСТВИЮ НА ИНFUЗОРИИ

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора, 125212, Москва

*Разработаны методы определения функциональной активности компонентов C1, C2, C3, C4 и мембраноатакующего комплекса классического пути, а также факторов B и D альтернативного пути комплемента человека с помощью автоматизированного приборного измерения обездвиживающего действия комплемента на инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Методы основаны на использовании искусственно получаемых реагентов, содержащих все необходимые компоненты комплемента, кроме тестируемого. Создан математический способ расчета активностей. Показана линейная зависимость скорости обездвиживания инфузорий от функциональной активности тестируемого компонента. Адекватность методов показана корреляцией результатов, полученных предложенным способом с разработанным ранее гемолитическим.*

Ключевые слова: *активность комплемента; методы определения; компоненты C1, C2, C3, C4; мембраноатакующий комплекс; факторы B и D; инфузории *Tetrahymena pyriformis*.*

O.N. Kuleshina, L.V. Kozlov

THE DETECTION OF ACTIVITY OF COMPONENTS AND FACTORS OF COMPLEMENT ACCORDING ITS EFFECT ON INFUSORIANS

The G.N. Gabritchevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russia

*The article considers the developed techniques of detection of functional activity of components C1, C2, C3, C4 and membrane attacking complex of classical pathway and also factors B and D of alternative pathway of human complement using automated device measurement of immobilizing effect on infusorians *Tetrahymena pyriformis*. The techniques are based on application of artificially produced reagents containing all necessary components of complement besides testing one. The mathematical mode of activities calculation is developed. The linear dependency of velocity of infusorians immobilizing from functional activities of testing component. The relevance of techniques is demonstrated by correlation of results derived using the proposed mode with the developed earlier hemolytic mode.*

Key words: *component activity; techniques of detection; components C1, C2, C3, C4; membrane attacking complex; factors B and D; infusorians *Tetrahymena pyriformis**

Введение. Система комплемента играет важную роль при воспалительных и инфекционных заболеваниях. Наибольшую диагностическую значимость имеют данные о функциональной активности компонентов системы по сравнению с количественным их содержанием. Вместе с тем до последнего времени практически единственным методом определения активности комплемента был гемолитический метод, имеющий ряд недостатков и неудобств применения. Трудности использования гемолитического метода состоят в необходимости предварительной сенсibilизации эритроцитов барана антителами к поверхностным антигенам этих клеток, поскольку активаторами классического пути комплемента являются иммунные комплексы. Другим недостатком гемолитического метода является то, что комплемент в крови больных в фазе острого воспаления способен приводить к реактивному гемолизу [1], что завышает показатели при определении активности комплемента. Для определения активности комплемента по альтернативному пути используется другая мишень — эритроциты кролика без дополнительной сенсibilизации, поскольку эритроциты барана не способны активировать альтернативный путь.

Преодолеть эти недостатки можно, используя новую мишень для тестирования активности комплемента — живые клетки одноклеточных организмов, чувствительных к воздей-

ствию системы комплемента. Комплемент морской свинки способен обездвигивать инфузории *Tetrahymena pyriformis* и при этом не требуется дополнительной сенсibilизации мишени антителами [2]. Инфузории *Tetrahymena pyriformis* обездвигиваются также под действием комплемента человека [13]. Автоматизировать биотестирование на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* позволяет прибор БиоЛаТ-3 (ООО "Европолитест") [4].

Задачей исследования была разработка удобных автоматизированных методов определения функциональной активности основных компонентов и факторов системы комплемента.

Материалы и методы. В работе использовали инфузории *Tetrahymena pyriformis* штамм WH14 из коллекции Всероссийского НИИ ветеринарной санитарии и экологии, которые стерильно культивировали на среде, приготовленной на дистиллированной воде и содержащей 0,5% панкреатического гидролизата казеина (ТУ 9385-002-00479327—94), 0,5% глюкозы (х.ч.), 0,1% дрожжевого экстракта (Springer 0251) и 0,1% NaCl (х.ч.). Для опытов использовали культуру инфузорий через 96 ч после пересадки петлей над горелкой.

Реактивы: барбитал натрия (мединал), диэтилбарбитуровая кислота (веронал) (Центральный аптечный склад), этилендиаминтетрауксусная кислота — ЭДТА, этиленгликольбис-N,N'-тетрауксусная кислота — ЭГТА (Serva, Германия), дрожжевой экстракт (Springer 0251, Германия). Остальные реактивы — отечественного производства качества не ниже ч.д.а.

Реагенты для определения гемолитической активности компонентов и факторов комплемента, представляющие со-

Для корреспонденции:

Кулешина Ольга Николаевна, науч. сотр.
Адрес: 125212, Москва, ул. адм. Макарова, 10
E-mail: filiana87@mail.ru

бой сыворотку крови человека, избирательно лишенную активности соответствующего компонента или фактора, получали методами, описанными в работах [5, 6], из пула не менее 10 сывороток здоровых людей, отобранного в Консультативно-диагностическом центре при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

Прибор БиоЛаТ-3 (ООО "Европолитест") [4].

Калибровочные графики получали, измеряя уменьшение числа живых клеток во времени для пула сывороток, выбранного в качестве стандарта.

Статистическую обработку результатов проводили по методу наименьших квадратов для линейной регрессии с определением коэффициента корреляции R .

Определение интегральной функциональной активности компонента С1, интегральной функциональной активности компонентов мембраноатакующего комплекса комплемента человека и компонентов С2—С4 проводили следующим образом. В измерительные ячейки прибора БиоЛаТ-3 вносили 200 мкл суспензии приблизительно 800 клеток инфузории *Tetrahymena pyriformis* в вероналовом буферном растворе рН 7,4, содержащем 0,075 М NaCl, 0,075 мМ Ca²⁺ и 0,25 мМ Mg²⁺, и 100 мкл того же буфера, содержащего от 1 до 50 мкл испытуемой пробы и от 5 до 40 мкл реагента RX, где X от 1 до 5 — реагент, избирательно лишенный активности соответствующего компонента комплемента (от С1 до С5). С помощью прибора БиоЛаТ-3 и совмещенного с ним компьютера определяли число живых клеток в ячейках каждую минуту. На основании динамики уменьшения числа живых клеток во времени (рис. 1) рассчитывали константу скорости реакции первого порядка, определяя тангенс угла наклона зависимости логарифма числа подвижных клеток от времени в

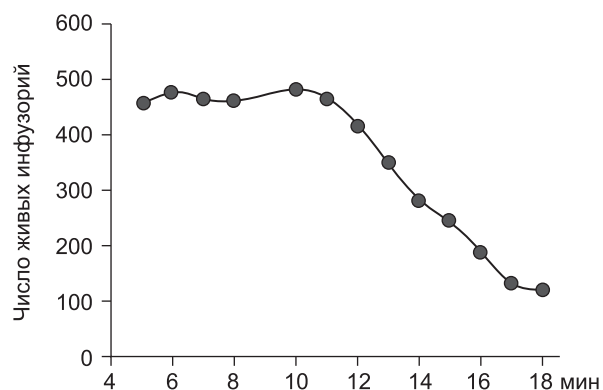


Рис. 1. Типичная динамика изменения числа подвижных инфузорий во времени.

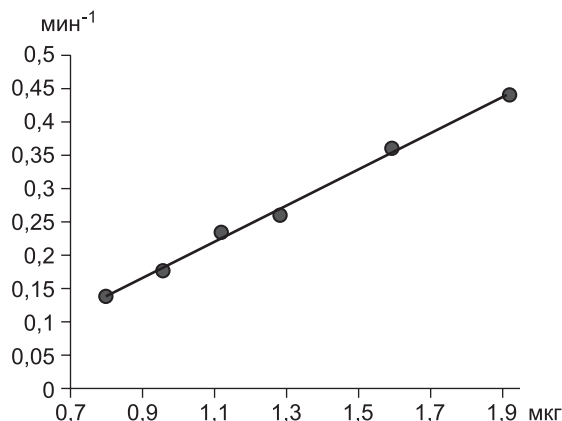


Рис. 2. Калибровочный график зависимости константы скорости обездвиживания инфузорий от количества активного компонента С1 ($R^2 = 0,997$).

период наблюдаемого уменьшения числа живых клеток. Калибровочные кривые (рис. 2—6) получали, измеряя уменьшение числа живых клеток во времени (см. рис. 1) для пула сывороток, выбранного в качестве стандарта.

Определение функциональной активности факторов D и В комплемента человека осуществляли, как описано ниже. В измерительные ячейки прибора БиоЛаТ-3 вносили 200 мкл суспензии приблизительно 800 клеток инфузории *Tetrahymena pyriformis* в вероналовом буферном растворе рН 7,4, содержащем 0,05 М NaCl, 0,83 мМ Mg²⁺ и 3,3 мМ этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА), и 100 мкл того же буфера, содержащего от 1 до 20 мкл испытуемой пробы и от 5 до 15 мкл реагентов RD или RB. Далее определение проводили, как описано выше для активности компонентов комплемента. Калибровочные графики приведены на рис. 7, 8.

Содержание активного С1 в стандартной сыворотке в соответствии с данными литературы принимали равным 160 мкг/мл [7], С2 — 2 мкг/мл [8], С3 — 1,2 мкг/мл [9], С4 — 400 мкг/мл [10]. Содержание активного компонента мембраноатакующего комплекса (условно С5) в стандартной сыворотке принимали равным 80 мкг/мл, что соответствует среднему содержанию каждого из компонентов С5—С9.

Результаты и обсуждение. Для определения гемолитической активности отдельных компонентов классического пути комплемента реакцию проводят с образцами сыворотки в количестве, не достаточном для осуществления самостоятельного лизиса, но в присутствии реагента RX (где X — тестируемый компонент), характеризующегося отсутстви-

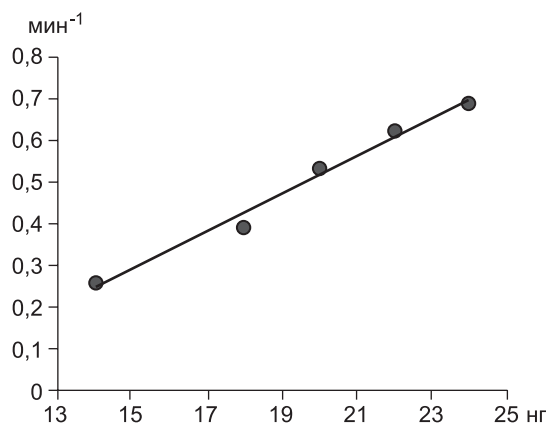


Рис. 3. Калибровочный график зависимости константы скорости обездвиживания инфузорий от количества активного компонента С2 ($R^2 = 0,98$).

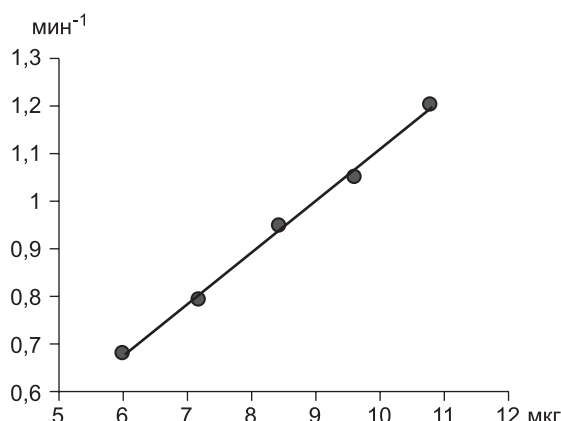


Рис. 4. Калибровочный график зависимости константы скорости обездвиживания инфузорий от количества активного компонента С3 ($R^2 = 0,99$).

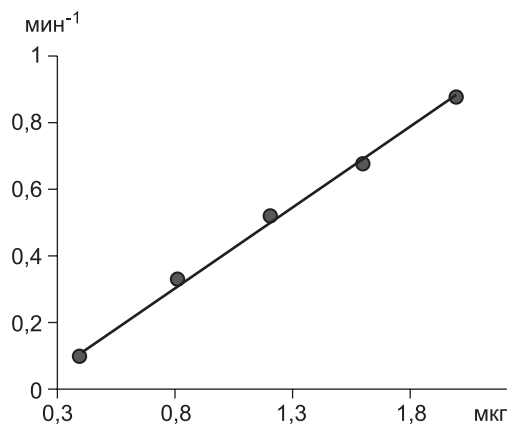


Рис. 5. Калибровочный график зависимости константы скорости обездвиживания инфузорий от количества активного компонента С4 ($R^2 = 0,99$).

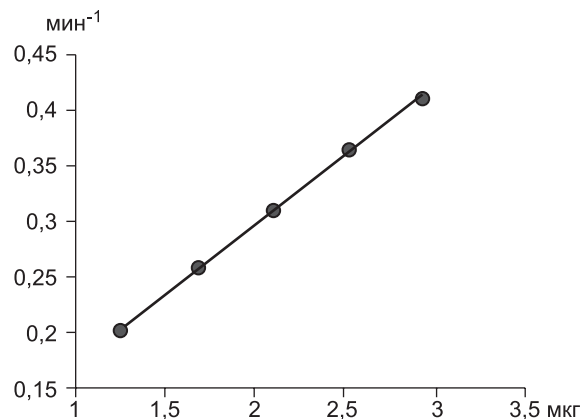


Рис. 7. Калибровочный график зависимости константы скорости обездвиживания инфузорий от количества активного фактора В ($R^2 = 0,999$).

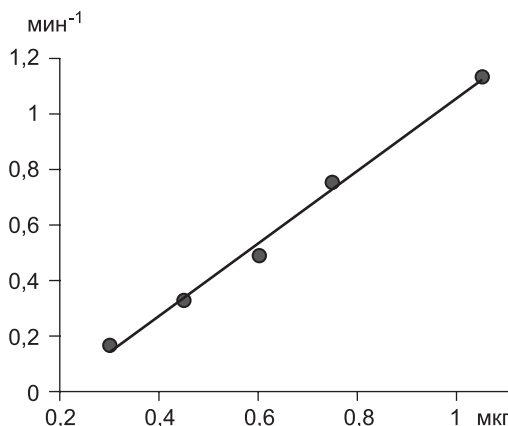


Рис. 6. Калибровочный график зависимости константы скорости обездвиживания инфузорий от количества активного компонента мембраноатакующего комплекса ($R^2 = 0,99$).

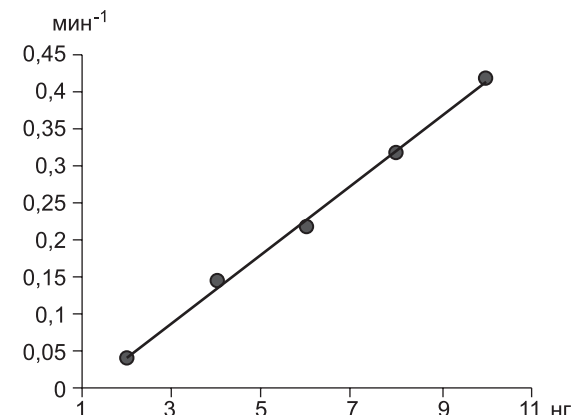


Рис. 8. Калибровочный график зависимости константы скорости обездвиживания инфузорий от количества активного фактора D ($R^2 = 0,99$).

ем тестируемого компонента, но избыточным содержанием остальных компонентов, необходимых для осуществления лизиса [5]. Размер фиксируемого гемолиза в этом случае определяется количеством функционально активного тестируемого компонента, находящегося в образце сыворотки, взятой в количествах, недостаточных для осуществления самостоятельного лизиса [5].

Для определения функциональной активности отдельных факторов альтернативного пути комплемента в тестируемом образце исследуют гемолиз эритроцитов кролика в присутствии ионов магния в бескальциевой среде, а также в присутствии реагента RX (где X — тестируемый фактор: В или D), характеризующегося отсутствием тестируемого фактора, но избыточным содержанием остальных компонентов, необходимых для осуществления лизиса. Размер фиксируемого гемолиза в этом случае определяется количеством функционально активного тестируемого фактора, находящегося в образце в наименьших количествах [6].

Указанные подходы использованы для определения функциональной активности компонентов классического и факторов альтернативного путей комплемента путем определения его действия на инфузории *Tetrahymena rugiformis*. При этом активация инфузориями классического пути комплемента происходила в присутствии ионов кальция и магния, а активация альтернативного пути — только ионов магния (избирательное связывание ионов кальция блокирует классический путь). В случае реагента R5, получаемого в результате активации альтернативного пути, в последнем потребляется не

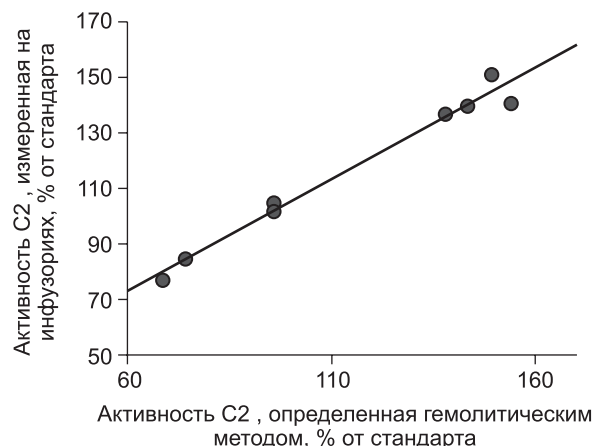


Рис. 9. Сравнение определения активности компонента С2 в сыворотке крови, проведенное двумя методами.

только С5, как предполагалось в работе [5], но и другие компоненты мембраноатакующего комплекса. Поэтому определение активности С5 с помощью реагента R5 на самом деле является определением интегральной активности мембраноатакующего комплекса.

При осуществлении измерения функциональной активности компонента по его воздействию на sensibilizированные эритроциты барана [5] регистрируют степень лизиса эритроцитов. Поскольку число активных комплексов из молекул компонента, приходящихся на 1 эритроцит и ответственных за гемолиз, определяется распределением Пуассона, для количественных расчетов необходимы расчеты, связывающие степень лизиса с числом активных молекул [5]. Использование другой мишени (живых клеток инфузорий) с другим результатом воздействия компонента (остановка движения клеток) требовало другой математической модели для расчета активности. Начальное действие компонента на инфузории приводит не к лизису клеток, а к их гибели, выражающейся в остановке движения, которое автоматически фиксируется прибором БиоЛаТ-3. На рис. 1 мы видим число движущихся клеток в данную минуту измерения, поскольку клетки не изменившие свои координаты программно не учитываются. Наблюдаемая на графике сигмоида характеризует переход между двумя состояниями: живое — неживое. Крутизна этого перехода (его скорость) может характеризовать активность компонента. Мы предположили, что такой переход может характеризоваться уравнением первого порядка: $n = n_0 e^{-kt}$, где n_0 — число живых клеток в начале процесса, n — число живых клеток во время t . Логарифмируя это уравнение, получаем линейную зависимость логарифма числа живых клеток от времени, характеризующую константу скорости процесса k с размерностью 1/мин: $\ln n_0 - \ln n = kt$. Действительно, как показывают калибровочные кривые для определения активности компонентов и факторов компонента (см. рис. 2—9), все они представляют собой прямые линии с коэффициентами корреляции не хуже $R^2 = 0,98$.

Для подтверждения адекватности предложенных методов проведено сравнение определений активности компонента C2 для нескольких сывороток гемолитическим методом [5] и методом определения по уменьшению числа живых инфузорий. Наблюдается хорошее соответствие обоих методов ($R^2 = 0,98$; см. рис. 9).

Заключение. Разработаны методы определения функциональной активности компонентов C1, C2, C3, C4 и мембраноатакующего комплекса классического пути, а также факторов В и D альтернативного пути компонента человека с помощью автоматизированного приборного измерения обездвиживающего действия компонента на инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Методы основаны на использовании искусственно получаемых реагентов, содержащих все необходимые компоненты компонента, кроме тестируемого. Создан математический способ расчета активностей. Показана линейная зависимость скорости обездвиживания инфузорий от функциональной активности тестируемого компонен-

та. Адекватность методов показана корреляцией результатов, полученных предложенным способом, и результатов, полученных разработанным ранее гемолитическим методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thompson R.A., Rowe D.S. Reactive haemolysis — a distinctive form of red cell lysis. *Immunology*. 1968; 14 (5): 745—62.
2. Sinclair I.J.B. The role of complement in the immune reactions of *Paramecium aurelia* and *Tetrahymena pyriformis*. *Immunology*. 1958; 1: 291—9.
3. Кулешина О.Н., Андина С.С., Попова О.П., Черемных Е.Г., Козлов Л.В. Активность компонента при коклюше. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 69 (2): 46—51.
4. Черемных Е.Г., Покатаев А.С., Гридунова В.Н. Прибор для биологических исследований. Патент № 2361913, РФ. 2009.
5. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П., Молчанова Н.Н. Модифицированные методы определения функциональной активности факторов компонента C2, C3, C4 и C5. *Биоорганическая химия*. 1982; 8 (5): 652—9.
6. Козлов Л.В., Соляков Л.С. Возможность участия зимогенных форм факторов В и D в активации альтернативного пути системы компонента. *Биоорганическая химия*. 1982; 8 (3): 342—8.
7. Antes U., Heinz H.P., Loos M. Enzyme-linked immunosorbent assay for C1q in human serum by use of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*. 1984; 74 (2): 299—306.
8. Kerr M.A., Porter R.R. The purification and properties of the second component of human complement. *Biochem. J.* 1978; 171: 99—107.
9. Hallett A.F., Cooper R. Complement activation in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 40: 306—11.

REFERENCES

3. Kuleshina O.N., Andina S.S., Popova O.P., Cheremnykh E.G., Kozlov L.V. Complement activity in whooping cough. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2013; 69 (2): 46—51. (in Russian)
4. Cheremnykh E.G., Pokataev A.S., Gridunova V.N. Instrument for biological research. Patent № 2361913, Rossiyskaya Federatsiya. 2009.
5. Kozlov L.V., Krylova Yu.I., Chikh V.P., Molchanova N.N. Modified methods for determining the functional activity of complement factors C2, C3, C4 and C5. *Bioorganicheskaya Khimiya*. 1982; 8 (5): 652—9. (in Russian)
6. Kozlov L.V., Solyakov L.S. Possible involvement of factors B and D zymogen forms in the alternative pathway activation of human complement system. *Bioorganicheskaya Khimiya*. 1982; 8 (3): 342—8. (in Russian)

Поступила 09.01.14
Received 09.01.14