

УДК 616-092

Скрининг-тест для определения функциональной активности классического пути системы комплемента

Шойбонов Б.Б.¹, Драпкина О.М.¹, Елиашевич С.О.¹, Федорович А.А.¹, Лавренова Е.А.¹, Карганов М.Ю.², Алчинова И.Б.², Толпыго С.М.³, Григорьева Д.В.⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 101990, Москва, Петроверигский пер., д. 10, стр. 3

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.Анохина». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

⁴ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии». 101000, Москва, ул. Петровка, д. 22А

Цель настоящей работы – разработка доступного теста для скрининга функциональной активности системы комплемента по классическому пути. **Материалы и методы.** В работе исследовали сыворотки крови 90 относительно здоровых лиц с избыточной массой тела (ИМТ >25) без метаболического синдрома. Иммуноферментный анализ функциональной активности системы комплемента по классическому пути проводили с использованием коммерческого набора. Реакцию лизиса эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами (ЕА), оценивали турбидиметрически по снижению оптической плотности суспензии при длине волны 620 нм, степень лизиса определяли по калибровочному графику. **Результаты.** Разработан простой скрининг-тест для определения функциональной активности классического пути системы комплемента. Корреляционный анализ показал высокую степень сходимости результатов ($r = 0,496$), полученных разными методами. **Заключение.** Скрининг-тест для определения функциональной активности классического пути системы комплемента является быстрым, информативным и доступным для рутинных исследований.

Ключевые слова: система комплемента; турбидиметрия; иммуноферментный анализ; ожирение.

Для цитирования: Шойбонов Б.Б., Драпкина О.М., Елиашевич С.О., Федорович А.А., Лавренова Е.А., Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Толпыго С.М., Григорьева Д.В. Скрининг-тест для определения функциональной активности классического пути системы комплемента. Патогенез. 2018; 16(4): 134-137

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.134-137

Для корреспонденции: Шойбонов Батожаб Батожаргалович, e-mail: shoibonov@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках реализации государственного задания № АААА-А17-117031310099-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила: 01.12.2018

A screening test for determining the functional activity of the complement system classic pathway

Shoibonov B.B.¹, Drapkina O.M.¹, Eliashevich S.O.¹, Fedorovich A.A.¹, Lavrenova E.A.¹, Karganov M.Yu.², Alchinova I.B.², Tolpygo S.M.³, Grigoriev D.V.⁴

¹ National Medical Research Center for Preventive Medicine, Petroverigskij Pereulok 10, Bld. 3, Moscow 101990, Russian Federation

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

³ P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

⁴ Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Petrovka Str. 22A, Moscow 101000, Russian Federation

The aim of this work was to develop an accessible test for screening the functional activity of the complement system classic pathway. **Materials and methods.** Blood serum from 90 relatively healthy, overweight (BMI>25) individuals without the metabolic syndrome was studied. Enzyme immunoassay of the complement system functional activity following the classic pathway was performed using a commercial kit. The lysis of antibody-sensitized sheep erythrocytes was evaluated turbidimetrically by a decrease in suspension optical density at a wavelength of 620 nm; the lysis intensity was determined by the calibration curve. **Results.** A simple screening test was developed to determine the functional activity of the complement classic pathway. A high degree of correlation ($r = 0.496$) was observed between results obtained by different methods. This screening test for evaluating the functional activity of classic complement system pathway is fast, informative, and available for routine research.

Key words: complement system; turbidimetry; enzyme immunoassay; obesity.

For citation: Shoibonov B.B., Drapkina O.M., Eliashevich S.O., Fedorovich A.A., Lavrenova E.A., Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Tolpygo S.M., Grigoriev D.V. [A screening test for determining the functional activity of the complement system classic pathway]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 134-137 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.134-137

For correspondence: Shoibonov Batojab Batojargalovich, e-mail: shoibonov@mail.ru

Funding. The work was carried out within the framework of the state task № AAAA-A17-117031310099-1.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 01.12.2018

Введение

Система комплемента является составляющей частью врожденного иммунитета и участвует, главным образом, в антибактериальной защите, индукции и усилении гуморального иммунного ответа, процессинге и элиминации образующихся иммунокомплексов [1]. Это множество функций комплемента обеспечивается благодаря содружественному взаимодействию около 40 плазмменных и мембранных белков, функционирующих по каскадному механизму и обладающих протеолитической активностью [2]. В настоящее время разработан тест определения функциональной активности системы комплемента по классическому пути, основанный на иммуноферментном анализе [3].

Цель настоящей работы – разработка доступного для рутинных исследований скрининг-теста для определения функциональной активности системы комплемента по классическому пути.

Материалы и методы исследования

В работе исследовали сыворотки крови 90 относительно здоровых лиц (из них 48 (53%) женщин) с избыточной массой тела (ИМТ > 25) без метаболического синдрома. Возраст обследованных составил от 40 до 50 лет (45 ± 5). Участие в обследовании подтверждено письменным согласием и одобрено Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ПМ» Минздрава России (протокол № 12 от 27.07.2017 г).

Забор крови осуществляли из локтевой вены после 14-часового голодания. В работе использовали веронал и мединал фирмы «Serva» (ФРГ), консервированные эритроциты барана производства «ЭКОлаб», г. Электрогорск (Россия), остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а. – отечественного производства. Приготовление эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами кролика (ЕА), изотонического вероналового буфера, рН 7,4 (VBS), буфера, содержащего ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (VBS^{2+}) описано в работе [4]. Иммуноферментный анализ функциональной активности системы комплемента по классическому пути с использованием коммерческого набора «EuroDiagnostics» (Швеция).

Полученные данные были статистически обработаны с помощью компьютерной программы «Microsoft Excel 2015» и надстройки «Attestat for Excel 12.0.5». При проведении корреляционного анализа использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми считались значения $p < 0,05$.

Результаты исследования

Определение оптимальной концентрации эритроцитов барана для теста определения функциональной активности системы комплемента. Эритроциты барана (Е) 3 раза отмывали в вероналовом солевом буфере (VBS^{2+}) центрифугированием в течение 10 мин при 2800 об./мин. Проводили сенсibilизацию эритроцитов барана антителами кролика (ЕА) как описано в работе [5]. Строили график зависимости оптической плотности суспензии ЕА при длине волны 620 нм от концентрации. Для этого 1% суспензию ЕА прогрессивно разводили в плоскодонной 96-луночной иммунологической планшете в объеме 50 мкл VBS^{2+} . Объем доводили до 100 мкл тем же буфером. Тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность на фотометре для иммуноферментного анализа при A_{620} .

Наблюдала линейную зависимость оптической плотности суспензии эритроцитов от концентрации в растворе до 0,56 опт. ЕД при A_{620} . Для теста определения функциональной активности классического пути активации системы комплемента нами выбрана концентрация эритроцитов барана, которая в объеме 100 мкл в лунке 96-луночного планшета дает оптическую плотность, равную 0,56, что соответствует концентрации эритроцитов $1,5 \times 10^8$ кл./мл. Для определения степени лизиса эритроцитов использовали калибровочный график, в котором степень лизиса эритроцитов оценивали по снижению оптической плотности при длине волны 620 нм. За 0% лизиса принимали оптическую плотность контроля ЕА на спонтанный лизис (50 мкл ЕА + 50 мкл VBS^{2+}), соответственно за 100% лизиса ЕА принимали оптическую плотность контроля на полный лизис ЕА (50 мкл ЕА + 50 мкл H_2O).

Калибровочный график позволяет определять степень лизиса эритроцитов в процентах по оптической плотности пробы без стадии центрифугирования и измерения гемоглобина в супернатанте и последующего расчета степени лизиса эритроцитов, что существенно упрощает анализ функциональной активности классического пути системы комплемента в рутинных исследованиях [6].

Титрование пулированной сыворотки крови человека для определения оптимальной концентрации сыворотки для комплемент-опосредованного лизиса ЕА показало, что степень лизиса от 10 до 80% зависит линейно от концентрации сыворотки в гемолитической системе при инкубации в течение 10, 15 и 30 мин. Для дальнейших исследований нами была использована 1% сыворотка в тест-системе, содержащей $0,75 \times 10^8$ кл./мл ЕА.

Максимальный лизис наблюдался в течение 10 мин. и при дальнейшей инкубации увеличение степени лизиса зависел от величины лизиса на 10-й минуте инкубации.

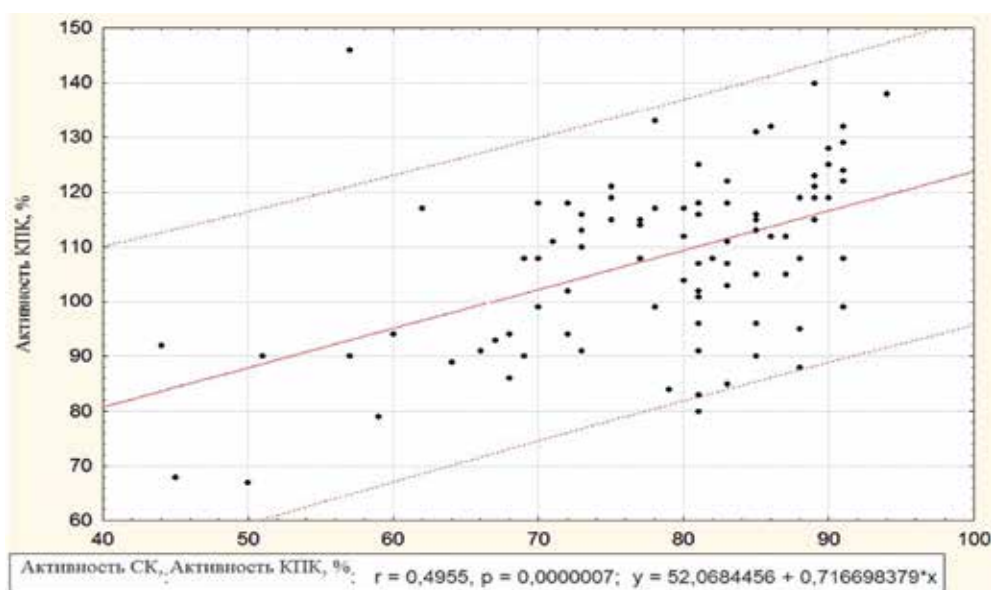


Рис. 1. Регрессионный анализ результатов определения функциональной активности классического пути системы комплемента с уравнением регрессии. По оси X – в тесте турбидиметрии, % лизиса. По оси Y – методом ИФА, % активности. Пунктирными линиями указан интервал 95% предсказуемости.

Проведены сравнительные исследования функциональной активности классического пути системы комплемента предлагаемым турбидиметрическим методом [6] и методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для проверки достоверности полученных результатов проведена оценка корреляционных взаимосвязей методом регрессионного анализа, результаты которого представлены на рис. 1.

Таким образом, предлагаемый тест определения функциональной активности классического пути системы комплемента коррелирует с иммуноферментным анализом активности классического пути системы комплемента с высокой достоверностью при $r = 0,496$.

Заключение

Некоторые преимущества, связанные с новым скрининг-тестом, способствуют его использованию при диагностических скринингах большого количества образцов сыворотки: простота (одностадийность теста без центрифугирования), быстрота (10 мин. инкубация для активации системы комплемента в тесте), высокая производительность (90 проб в каждой плашке может быть считано менее чем за 1 мин. ридером для ИФА), экономичность (требует меньше расхода реагентов и сыворотки), и оценка активности системы комплемента по калибровочному графику. Результаты, полученные с использованием данного теста, могут быть выражены или как процент активности по отношению к референтной пулированной сыворотке, или как конечная степень лизиса в процентах.

Список литературы

1. Ricklin D., Lambris J.D. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *J. Immunol.* 2013; 8(190): 3839-3847. DOI: 10.4049/jimmunol.1203200.

2. Carroll M.C., Isenman D.E. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity.* 2012; 37: 199-207. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.002
3. Palarasar Y., Nielsen C., Sprogee U., Christensen M.I., Lillevang., Madsen H.O., Bygum A., Koch C., Skjodt K., Skjoedt M.-O. Novel assays to assess the functional capacity of the classical, the alternative and the lectin pathways of the complement system. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 164(3): 388-395. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04322.x
4. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V., Zinchenko A.A., Lakhtin V.M., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first reprotolysin inhibiting the classical pathway of complement. *Mol. Immunol.* 2005; 42: 1141-1153. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.11.009
5. Шойбонов Б.Б., Хайбулин В.Р., Баронец В.Ю., Осипов А.В., Панченко Л.Ф. Коэффициент эффекторной функции гетерофильных антител ($K_{эфгА}$) – новый показатель состояния гуморального иммунитета. *Патогенез.* 2011; 9(1): 43-49.
6. Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Шойбонов Б.Б., Григорьева Д.В., Толпыго С.М. Скрининг-тест для определения функциональной активности классического пути системы комплемента. Заявка о выдаче патента № 2018141817 (от 28.11.2018 г.)

References

1. Ricklin D., Lambris J.D. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *J. Immunol.* 2013; 8(190): 3839-3847. DOI: 10.4049/jimmunol.1203200.
2. Carroll M.C., Isenman D.E. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity.* 2012; 37: 199-207. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.002
3. Palarasar Y., Nielsen C., Sprogee U., Christensen M.I., Lillevang., Madsen H.O., Bygum A., Koch C., Skjodt K., Skjoedt M.-O. Novel assays to assess the functional capacity of the classical, the alternative and the lectin pathways of the complement system. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 164(3): 388-395. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04322.x
4. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V., Zinchenko A.A., Lakhtin V.M., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first reprotolysin inhibiting the classical pathway of complement. *Mol. Immunol.* 2005; 42: 1141-1153. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.11.009

-
5. Shojbonov B.B., Hajbulin V.R., Baronec V.YU., Osipov A.V., Panchenko L.F. [The coefficient of effector function of heterophilic antibodies (C_{EFGA}) is a new indicator of the state of humoral immunity]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2011; 9(1): 43-49. (in Russian)
6. Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Shojbonov B.B., Grigor'eva D.V., Tolpygo S.M. [Screening test to determine the functional activity of the classical pathway of the complement system]. Patent application № 2018141817 (28.11.2018)

Сведения об авторах:

Шойбонов Батожаб Батожаргалович – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Драпкина Оксана Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Елиашевич Софья Олеговна – лаборант-исследователь отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федорович Андрей Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Лавренова Евгения Александровна – лаборант-исследователь отдела фундаментальных и прикладных аспектов ожирения Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Карганов Михаил Юрьевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Алчинова Ирина Борисовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Толпыго Светлана Михайловна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии мотивации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.Анохина»

Григорьева Диана Викторовна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник поликлинического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»