

На правах рукописи

ЛАХТИН

Михаил Владимирович

**ВАРИАНТЫ ИЗОТИПИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТА C4
КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА**

14.00.36 - аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки
«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Козлов Леонид Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук Мазурова Изабелла Константиновна

доктор биологических наук Суровцев Владимир Иванович

Ведущая организация:

Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской Академии Наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 2008 г. в ___ часов
на заседании специализированного совета Д 208.046.02 при ФГУН «Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора РФ по адресу: 125212 Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «Московский научно-
исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора РФ.

Автореферат разослан ___ апреля 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Л.И. Новикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одним из направлений профилактической медицины является создание унифицированных современных тест-систем для клинических обследований гуморального статуса человека. В группе молекулярной иммунологии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского разрабатываются иммуноферментные методы определения функциональной активности компонентов и факторов системы комплемента.

Ключевая роль компонента С4 состоит в его участии в начале каскада ферментативных реакций, осуществляемых системой комплемента после инициации классического пути, когда активацией С4 начинается формирование С3-конвертазы (С4b2a). Компонент С4 представлен изо типами С4А и С4В, которые кодируются двумя близко расположенными генами в коротком плече 6 хромосомы. В популяции нулевые аллели *c4aq0* или *c4bq0* встречаются с относительно высокой частотой (до 30%), что выражается в дефицитах С4А и С4В. Люди с выраженными дефицитами изо типов С4 подвержены риску заболеваний.

Структура изо типов С4А и С4В характеризуется наличием внутреннего тиолактонного кольца -CysGlyGluGlu-, функционирующего таким образом, что С4А преимущественно реагирует с белками, а С4В – углеводами. Различия функционирования С4А и С4В обусловлены тем, что в реакционном центре С4В в непосредственной близости к тиолактонному кольцу находится остаток His¹¹⁰⁶, замещенный на остаток Asp¹¹⁰⁶ в молекуле С4А. В результате в условиях раскрытия тиолактонного кольца С4А преимущественно взаимодействует с белками, а наличие His¹¹⁰⁶ создает условия для преимущественного взаимодействия С4В с углеводами.

Компонент С4 комплемента человека играет важную роль в иммунном ответе. Для иммунного ответа необходимо, чтобы антиген, опсонизированный комплементом, был опознан дендритными клетками, несущими на своей поверхности рецепторы комплемента. Опсонизация зависит от того, будет ли на первом этапе с антигеном ковалентно связываться С4. Дефицит С4А или С4В приводит к ухудшению иммунного ответа на белковый или углеводный антиген, соответственно. Врожденные дефициты С4А и С4В наблюдаются в случаях некоторых аутоиммунных болезней, бактериальных и вирусных инфекций. Ранее в исследованиях группы молекулярной иммунологии были получены данные о роли врожденных дефицитов отдельных изо типов в предрасположенности к бактерионосительству (на примере хламидиоза), язве желудка, глаукоме.

Для обнаружения дефицитов был разработан метод иммуноферментного анализа, основанный на различиях в реакционной способности изомеров С4. Тем не менее возможно совершенствование метода с целью повышения его чувствительности и снижения себестоимости.

Цель исследования

- разработка вариантов иммуноферментного анализа функциональной активности изомеров С4А и С4В, а также их количеств после изоэлектрофоретического разделения изомеров и применение разработанных методов в исследовании С4-изотипического статуса сывороток в норме и патологии.

Задачи исследования

- разработать варианты иммуноферментного анализа функциональной активности С4А и С4В в микропанели; на их основе разработать микропанельные варианты иммуноферментного анализа для определения констант ингибирования акцепторами функционально активных С4А или С4В;
- разработать варианты иммуноферментного анализа, включающие изоэлектрофокусирование сывороток в полиакриламидном геле, электроблоттинг, иммуноблоттинг и хемилюминесценцию пероксидазной реакции в режиме живого изображения, для визуального определения С4А и С4В;
- апробировать разработанные варианты иммуноферментного анализа на сыворотках больных с дефицитами С4А и С4В;
- с помощью разработанных вариантов иммуноферментного анализа исследовать дефициты С4А и С4В в сыворотках крови людей, в том числе с нарушениями беременности и при иммунном ответе на *Corynebacterium diphtheriae*.

Научная новизна

- разработаны высокочувствительные варианты иммуноферментного анализа функциональной активности изомеров С4А и С4В компонента С4 комплемента человека в микропанели и количественного хемилюминесцентного анализа изомеров С4А и С4В, позволяющие определять любые варианты дефицитов изомеров С4 в сыворотке, а также выявлять индивидуальные сывороточные особенности изомеров С4А и С4В;

- разработан высокочувствительный метод микропанельного иммуноферментного анализа ингибирования функциональной активности индивидуальных изоформ С4А и С4В сыворотки человека бактериальными антигенами;
- исследование наличия дефицитов изоформ компонента С4 комплемента может быть использовано в диагностике течения гестационного процесса и выделения групп повышенного риска женщин в невынашивании беременности, особенно по типу неразвивающейся беременности;
- наличие дефицитов С4В в сыворотке крови может приводить к снижению уровня антибактериального иммунного ответа на *Corynebacterium diphtheriae*.

Практическая значимость работы

- Упрощена технология изотипирования компонента С4 комплемента в микропанели, предусматривающая использование более чувствительных и доступных реагентов – антител против С3 и пероксидазного конъюгата этих антител по сравнению с реагентами на основе С4 человека;
- метод позволяет определять дефицит С4А и С4В в сыворотке больных, что может быть расценено, как фактор риска развития аутоиммунных и инфекционных заболеваний и может быть рекомендован для широкого использования в клинических условиях для диагностики нарушений в иммунной системе вместе с другими клиническими показателями;
- практическая ценность работы подтверждена двумя патентами.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан вариант иммуноферментного анализа функциональной активности изоформ С4А и С4В в микропанели, отличающийся тем, что используются антитела против С3 человека вместо антител против С4 человека.
2. Разработаны визуальные варианты одновременного количественного определения изоформ С4А и С4В, включающие разделение белков сыворотки изоэлектрофокусированием в полиакриламидном геле, электроблоттинг, иммуноблоттинг и хемилюминесценцию пероксидазы в режиме живого изображения.
3. Повышены возможности использования на практике метода определения компонента С4 комплемента человека для диагностики различных заболеваний.

Апробация материалов диссертации. Апробация проведена на совместном заседании секций «Медицинская биотехнология» и «Общая и прикладная иммунология» Ученого Совета ФГУН «МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора РФ, 14 апреля 2008 года, протокол № 3. Результаты докладывались на III всероссийской школеконференции «Химия и биохимия углеводов» (9-11 сентября 2004, Саратов), 7-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2005»; май 2005, Санкт-Петербург; Международном конгрессе "Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний" (сентябрь 2006, Москва), VIII Российском форуме "Мать и дитя" (октябрь 2006, Москва), IX съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (26-27 апреля 2007, Москва).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 157 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, главы с обзором литературы на тему «Система комплемента человека», главы с описанием материалов, приборов и методов (включая собственные результаты), главы с изложением основных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 322 источника, в том числе 47 на русском языке. Работа иллюстрирована 9 таблицами и 12 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследовали сыворотки людей следующих групп:

1. 22 здоровых детей в возрасте менее 10 лет (сыворотки предоставлены центром государственного санитарно-эпидемиологического надзора Западного Административного округа г. Москвы);
2. 12 беременных с нормальным течением беременности; 30 беременных с нарушениями течения беременности (сыворотки предоставлены кафедрой акушерства и гинекологии Московского Российского Государственного Медицинского Университета (зав. Кафедрой профессор О.В. Макаров);
3. 40 пациентов с язвой желудка, язвой двенадцатиперстной кишки, гастродуоденитами, ревматоидным артритом, васкулитами, антифосфолипидным синдромом, системной красной волчанкой, волчаночно подобными заболеваниями, аллергическими отеками (сыво-

ротки предоставлены КДЦ при ФГУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора РФ).

Использовали разработанные нами варианты иммуноферментного анализа изотипов С4А и С4В в сыворотке человека (описаны ниже в разделе 1 и главе 3 диссертации).

Для расчета количества белка в разведениях сыворотки применяли компьютерную программу для иммуноферментного анализа, разработанную ТОО «Микрофлора» при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Достоверность различий между средними значениями исследованных показателей определялась с помощью компьютерных программ Statistica. Для количественного анализа хемилюминесцентных картин использовали компьютерные программы *LabWorks Version 4 (UVP, Calif., США)*.

Отдельные фрагменты работы выполняли совместно с Савченко Т.Н., Дондуп О.М. и Гора Н.В. (клиническая характеристика групп пациенток с различным протеканием беременности и анализ изотипов С4 в сыворотках беременных новым методом), а также Шмелевой Е.А и Макаровой С.И. (определение противодифтерийных антибактериальных и антитоксических антител).

Результаты исследования и их обсуждение

1. Разработка вариантов иммуноферментного анализа изотипов С4А и С4В

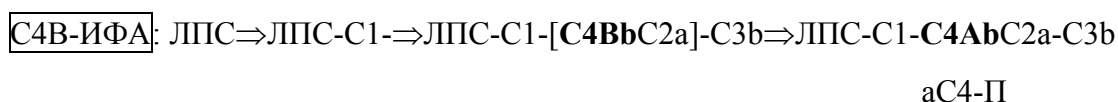
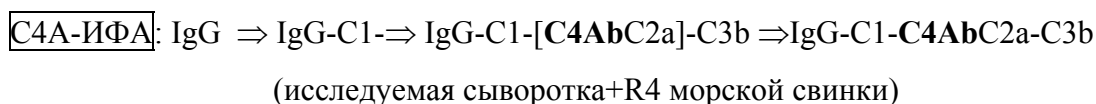
Одним из направлений профилактической медицины является создание современных тест-систем для клинических обследований населения. Нами разработаны варианты иммуноферментного анализа изотипов С4А и С4В в микропанели и на блоте после электрофокусирования.

1.1. Разработка микропанельных вариантов иммуноферментного анализа функциональной активности изотипов С4А и С4В

Ранее были разработаны микропанельные варианты иммуноферментного анализа (ИФА) функциональной активности С4А и С4В, предусматривающие сорбцию в полистироловых лунках микропанели активаторов комплемента – IgG при определении С4А или липополисахарид (ЛПС) из клеточных стенок *Salmonella typhi* (препарата «Пирогенал») при определении С4В. В лунках микропанели активаторы инициировали каскад комплемента сыворотки при добавлении растворов, содержащих С4 в присутствии реагента R4 (сыворотки морской свинки или человека, не содержащей функционально активного С4,

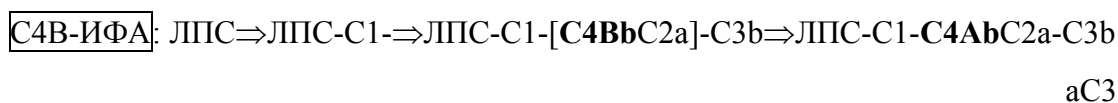
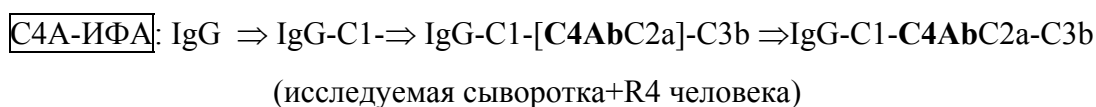
отсутствие которого на фоне избытка прочих компонентов комплемента делает зависимым развитие каскада от определяемого C4). В результате активации комплемента с активатором на поверхности лунок микропанели ковалентно связывается C4b (фрагмент C4 в виде изотипических фрагментов C4Ab и C4Bb), количество которого определяли с помощью пероксидазного конъюгата антител против C4 человека (aC4-П). Принцип определения функциональной активности изотипов C4A и C4B таков:

aC4-П



В новых вариантах иммуноферментного анализа функциональной активности изотипов C4A (вариант *C4A-в-микропанели*), C4B (вариант *C4B-в-микропанели*) в разных микропанелях использовали те же стадии, указанные выше, и R4 человека. Способ основан на способности функционально активного комплекса C4b2a (протеиназы – конвертазы C3) активировать C3 с образованием фрагмента C3b, который ковалентно связывается с активатором на поверхности лунок микропанели в непосредственной близости от C4b. Количество C4b определяется путем измерения количества C3b. Тем самым достигается определение функциональной активности C4A или C4B иммуноферментным методом, пригодным для стандартизации:

aC3-П



Преимуществами новых вариантов микропанельного иммуноферментного анализа являются: а) увеличение чувствительности метода за счет амплификации процесса на стадии функционирования C3-конвертазы, б) использование для получения антител более стабильного выделяемого из сыворотки в большем (по сравнению с C4) количестве компонента комплемента – C3, в) возможность получения моноспецифических поликлональных антител против C3 в больших количествах и с более высокими рабочими разведениями по сравнению с антителами против C4 человека; г) доступность и низкая цена коммерческих антител против C3. Кроме того, эти варианты иммуноферментного анализа проще и быстрее других методов, например, иммуноферментного анализа на блоте после электрофокусирования в геле.

Длительность анализа 20 сывороток – до 5 часов (с использованием готовых сенсублизированных пирогеналом или IgG микропанелей со сроком их хранения до 3 месяцев при -20°C).

Калибровочные графики для определения функциональной активности C4A и C4B показаны на рис. 1. Результаты исследования стандартной (объединенной сыворотки от 40 здоровых доноров), индивидуальных бездефицитных сывороток и сывороток с дефицитом C4A или C4B показали линейную положительную корреляцию между значениями оптической плотности поглощения субстрата и количеством C4 в лунках в микропанельном иммуноферментном анализе функциональной активности C4A или C4B.

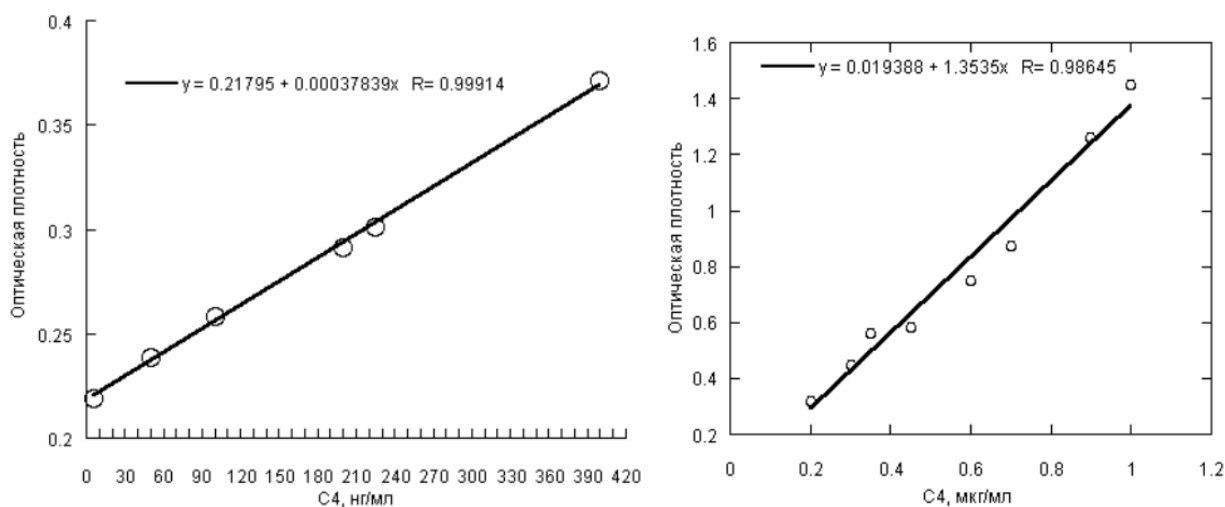


Рис. 1. Зависимость оптической плотности поглощения субстрата от количества C4 в стандартной пулированной сыворотке, определенного иммуноферментным анализом функциональной активности C4A (левый график) и C4B (правый график).

1.2. Разработка новых вариантов микропанельного иммуноферментного анализа ингибирования изоформ C4A и C4B человека антигенами

Ранее было исследовано ингибирование ковалентного связывания активированного фрагмента C4b компонента комплемента человека с его естественной мишенью – IgG человека. Поскольку ацилирование белковой мишени осуществляется преимущественно изоформой C4A, сравнение ингибирующего действия различных акцепторов проводилось в отношении активированного фрагмента C4Ab из изоформы C4A. Метод позволял сравнивать опсонизирующие свойства C4A в отношении преимущественно белковых антигенов. Хотя при активации C4 происходило связывание и C4B с полисахаридным антигеном, это

не мешало ковалентной сорбции С4А на мишени – IgG, которое и тестировалось в рамках иммуноферментного анализа.

Нами разработаны варианты микропанельного иммуноферментного анализа для оценки механизмов взаимодействия антигенов с С4А и С4В. Основой нового варианта ингибиторного иммуноферментного анализа являются разработанные варианты микропанельного иммуноферментного анализа С4А и С4В, описанные выше. Ингибирование обоих изоформ оценивали по изменению количества связанного с лунками микропанели С3b, проявляемого посредством антител против С3 человека. Об эффективности связывания С4b судили по активности образовавшейся С3-конвертазы (С4b2а), т.е. по количеству связанного на мишени С3b.

Для исследования взаимодействия акцепторов с С4А и С4В, в отдельности, был применен новый вариант метода определения активностей С4А и С4В по формированию С3-конвертазы, причем определение активности этих изоформ проводилось в присутствии акцепторов, взятых в различных концентрациях. Как и для аналогичной схемы, описанной ранее, ингибирование связывания С4b на микропанели при условии, когда концентрация акцептора [I] много выше концентрации компонента С4, описывается уравнением, аналогичным уравнению Михаэлиса-Ментен:

$$\alpha = \frac{\beta[I]}{K_i + [I]},$$

где α - доля связанного с ингибитором активированного С4b (процент ингибирования), β - эффективность процесса ковалентного присоединения ингибитора к С4b (максимальный процент ингибирования), K_i – константа диссоциации обратимого комплекса акцептора (ингибитора) с С4b, [I] – концентрация ингибитора.

Были исследованы константы ингибирования дифтерийным анатоксином, используемым в качестве компонента поливакцин, и вакциной Кодивак (полисахаридной фракции клеточной стенки нетоксигенного штамма *Corynebacterium diphtheriae*) образования С3-конвертазы активированным С4b для изоформ С4А и С4В, то есть, равновесные константы диссоциации комплексов активированный С4b – ингибитор. Следует отметить, что эти же дифтерийные антигены используются при мониторинге противодифтерийного иммуноглобулинового ответа в организме человека. Данные приведены в табл. 1.

Таблица 1

Константы ингибирования образования С3-конвертазы дифтерийным

анатоксином и Кодиваком в экспериментах с участием С4А и С4В

Антиген	K_i , мкг/мл	
	С4А	С4В
Анатоксин	105 ± 10	100 ± 3
Кодивак	171 ± 29	26 ± 3
Анатоксин/ Кодивак	0,6	3,9

Из табл. 1 видно, что константа ингибирования дифтерийным анатоксином одинакова для обоих изотипов компонента С4, в то время как Кодивак ингибирует активированный С4В в 6,5 раз лучше, чем С4А. В ингибировании С4А дифтерийный анатоксин почти в 2 раза предпочтительнее Кодивака, а в ингибировании С4В в 4 раза Кодивак предпочтительнее анатоксина. Следует отметить, что величина K_i для С4А и дифтерийного анатоксина практически совпала с аналогичной K_i (109 ± 47 мкг/мл), рассчитанной другим методом ранее. Полученные данные согласуются с представлениями о том, что С4А лучше связывается с белками, а С4В – с углеводами.

1.3. Разработка вариантов хемилюминесцентного анализа на блоте после изоэлектрофокусирования для визуального иммунохимического определения количеств изотипов С4А и С4В

Иммуноферментный хемилюминесцентный анализ С4А и С4В на блоте является многоэтапным, включающим десалирование сыворотки, ее изоэлектрофокусирование в геле, электроблотинг, иммуноблотинг и регистрацию хемилюминесценции. Были оптимизированы все этапы.

Как следует из литературных данных, изоэлектрофокусирование в полиакриламидном геле, использовалось, по-видимому, только однажды для определения С4А и С4В плазмы в сложном варианте проявления изотипов путем наслоения на ПААГ сенсibilизированных антителами эритроцитов барана с последующей регистрацией гемолиза. При этом не удалось избежать перекрытия областей С4А и С4В.

Известен один случай хемилюминесцентного анализа изотипов С4А и С4В, разделенных в агарозном геле и блотированных с последующим проявлением изотипов пероксидазными конъюгатами антител против антигенов *Chido* (для проявления С4В) и *Rogers* (для проявления С4А). В отличие от этих авторов мы использовали поликлональные антитела против С4 человека, которые доступнее моноклональных антител. Кроме того, по

нашим данным в оптимизированных условиях проведения хемилюминесцентного анализа на блоте поликлональные антитела позволяют точно устанавливать дефицит изотипа, а также идентифицировать множественные формы изотипов (субизотипы). Нами также был использован субстрат *BioWest*, в 14 раз более чувствительный, чем субстрат *ECL Plus*, что повысило разрешающую способность метода при выявлении низких количеств изотипов и минорных субизотипов. Для снижения фона на блоте мы применили термообработку буфером при 50-55°C (активность иммобилизованной пероксидазы не снижается) и pH (4,2-4,5)-обработку (сохраняется связывание антител против С4) в режиме электроблотинга.

Десиалирование сывороток сиалидазой *Clostridium perfringens* используется для электрофоретического разделения С4А и С4В. Мы использовали десиалирование сывороточных С4А и С4В сиалидазой при 56°C в течение 30 мин (условиях термоденатурации комплемента). Это повысило эффективность десиалирования С4А и С4В.

Нами были разработаны варианты хемилюминесцентного анализа изотипирования компонента С4 комплемента человека. Процедура хемилюминесцентного анализа изотипов С4А и С4В сывороток включает отбор негемолизированных сывороток; обработку сиалидазой в присутствии этилендиаминтетрацетата натрия в течение ночи при комнатной температуре в темноте в условиях термоденатурации комплемента в первые 30 минут десиалирования; разделение асиалосыворотки изоэлектрофокусированием в градиенте pH 3-5 в полиакриламидном геле в присутствии мочевины и сахарозы; электроперенос белков из геля на иммобилон-Р при pH 8.3; обработку полученного блота конъюгатом пероксидазы с антителами против С4 человека в течение ночи при 4°C; промывку блота в условиях термостатирования (50-55°C); проявление пероксидазы на блоте хемилюминесцентным субстратом с регистрацией картин возрастания, достижения максимума и спада хемилюминесценции С4А и С4В. Для улучшения фона и выраженности полос проводили обработку блота раствором уксусной кислоты с pH 4,2-4,5 в режиме электроблотинга. При этом антитела остаются связанными с блотом, а удаляются непрочно связанные слабо хемилюминесцирующие фоновые примеси между полосами субизотипов, между изотипами, а также между изотипами и положением электродов (рис. 2). Весь фон на блоте, обработанном бычьим сывороточным альбумином, становился однородным. Кроме того, при слабокислых pH анионы ацетата насыщают ацетат-связывающий субсайт в геме пероксидазы, располагающийся недалеко от субсайта связывания кислорода, что, по-видимому, приводит к уравниванию интенсивности хемилюминесценции пероксидазы в областях С4А и С4В. Полное удаление антител против С4 и полное отсутствие хемилюминесценции в областях С4А и С4В (на блоте-1) наблюдалось только в условиях электропереноса связанных с блотом антител против С4 при pH 2,9 (появление хемилюминесцирующих

отпечатков на блоте-2, адекватно отражающих количественное превосходство одного из изотипов).

На рис. 2 показаны примеры разделения С4А и С4В на блоте после изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле для некоторых сывороток, приведенных далее в табл. 2. Видно, что хемилюминесцентный анализ позволяет разделять С4А и С4В с значительным запасом чистого пространства между изотипами на дисплее компьютера, между анодом и С4А и между катодом и С4В. Метод не только визуально выявляет дефицит одного из изотипов (подтверждается расчетом отношения С4А/С4В по данным количественного сканирования картины хемилюминесценции) при сравнении с стандартной сывороткой, но и дает оценку относительного содержания каждого из изотипов в наборе сывороток на едином блоте. Определены интервалы изоэлектрических точек областей сывороточных изотипов С4А (рI 4,0 – 4,3) и С4В (4,58-4,65), включающих наборы субизотипов. Субизотипы характеризовали индивидуальные свойства сывороток и включали несколько изоформ, в том числе 1-2 мажорных. В зависимости от образца сыворотки, число субизотипов варьировало до 5 форм, что согласуется с данными литературы. Общее число различающихся по гемолитической активности субизотипов (аллотипов), исследованных в различных электрофоретических условиях, в популяции людей по данным литературы составляет несколько десятков.

Проведение хемилюминесцентного анализа 7 и более сывороток на едином блоте позволяет оценивать в сравниваемых сыворотках относительное содержание С4А или С4В и их мажорных субизотипов (рис. 2).

Индивидуальные свойства свечения в области С4А особенно разнообразны до обработки блота рН 4 (могут присутствовать дополнительные 1-2 минорные полосы). Помимо градиента рН 3-5, для анализа С4А могут быть использованы градиенты рН 4-6, 3-6 или их смесь. В качестве дополнительного контроля полученных результатов использовали электрофоретический полусухой перенос пероксидазного комплекса с полученного блота (блота-1) на блот-2 при рН 2,9. Анализ хемилюминесценции блота-2 подтвердил результаты установления дефицита изотипа С4А или С4В, полученные на блоте-1.

Анализ С4В упрощается после обработки блота при рН 4, а также при использовании низковольтного режима изоэлектрофокусирования в геле в течение ночи при 10°C. Помимо градиента рН 3-5, для сравнительного анализа С4В сывороток может быть использован градиент рН 3-6. Получение блота-2 может улучшить выраженность области С4В.

↓ ↓ ↓ ↓ **с**

АНОД

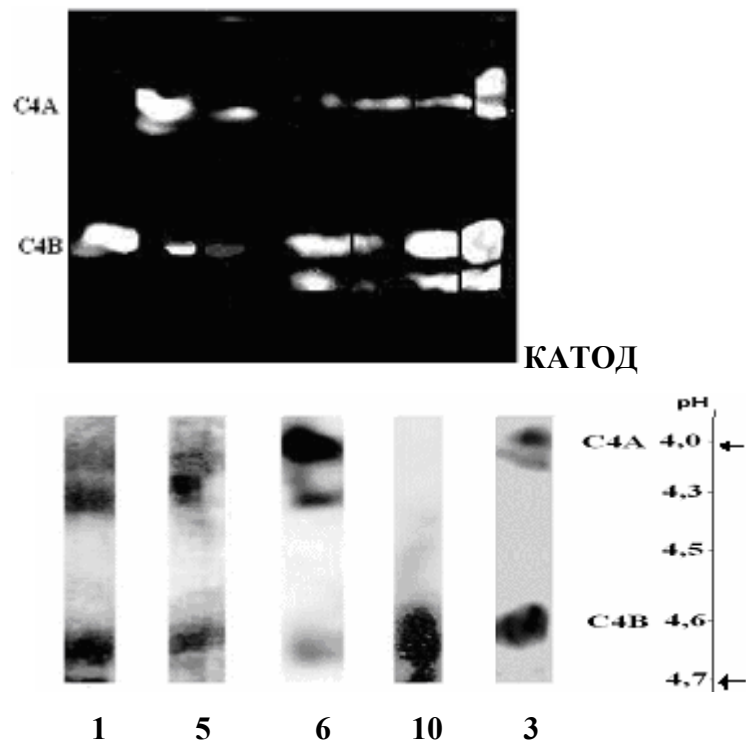


Рис. 2. Примеры хемилюминесценции областей C4A и C4B. Верхняя фотография – хемилюминесценция C4A и C4B семи асиалосывороток на едином блоте в период времени, когда минорные формы субизотипов уже не видны, но сохраняется хемилюминесценция мажорных форм субизотипов (стрелками показаны дефициты C4A или C4B; С – сыворотка сравнения с выраженными C4B и C4A). Нижняя фотография – типы хемилюминесценции изотипов C4A и C4B сывороток с полными наборами субизотипов (свечение инвертировано): бездефицитные сыворотки – 1, 5, с дефицитом C4A – 3, 10, или C4B – 6 (в случаях 3 и 10 по данным сканирования количеств C4A и C4B на блоте). Значения pH в геле определены на pH-метре; использованы также маркеры *kit 2,5-6,5* (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), термоденатурированный и мономерный БСА (показано стрелками) с pI 4,07 и pI 4,71, соответственно.

2. Определение дефицитов изотипов C4A и C4B разработанными вариантами микропанельного иммуноферментного анализа и хемилюминесцентного анализа на блоте в сыворотках пациентов и здоровых доноров

Оценка дефицитов изотипов C4A и C4B компонента C4 комплемента человека основана на расчете отношения их количеств, определяемых микропанельным иммуноферментным анализом или хемилюминесцентным анализом.

2.1. Исследование дефицитов C4A и C4B в сыворотках пациентов

Наличие нулевых аллелей *c4aq0* и *c4bq0* коррелирует с повышенной встречаемостью ряда аутоиммунных заболеваний. Повышенная частота встречаемости дефицитов C4A или C4B при ряде заболеваний была описана ранее в работах группы молекулярной иммунологии.

Высокая частота встречаемости нулевых аллелей говорит о распространенности того или иного дефицита C4 (в 15% для каждого – C4A или C4B) вплоть до 30% в популяции. Соотношение количеств (или активностей) C4A/C4B в норме (в 70% случаев) варьирует около 1, при монодефицитах C4A оно не превышает 0,50, а при монодефицитах C4B оно может превышать 2. При двойных дефицитах (в 2,25% для каждого) ожидаемые отношения примерно равны 0, 1 или более 2. Тройные дефициты еще менее вероятны – 0,3%, а полные – 0,05%. Из этих предварительных расчетов следует, что для обнаружения наиболее часто встречающихся врожденных дефицитов достаточно определять соотношение количеств (или активностей) C4A/C4B, а в том сомнительном случае, когда имеется двойной гетерогенный дефицит при соотношении около 1, оценивать общее снижение количества и активности C4.

С помощью разработанных вариантов иммуноферментного анализа было проведено сравнительное (в микропанели и на блоте) определение соотношений C4A/C4B в 22 сыворотках больных с язвой желудка, язвой двенадцатиперстной кишки, гастродуоденитами. Результаты подтвердили полученные ранее данные о частоте дефицитов изотипов C4 в сыворотках больных с нарушениями в желудочно-кишечном тракте. Во всех 19 тестированных сыворотках пациентов с язвой желудка были выявлены дефициты только C4A.

Были исследованы также сыворотки больных с системной красной волчанкой, волчаночно подобными заболеваниями, ревматоидным артритом, васкулитами, антифосфолипидным синдромом, аллергическими отеками, содержащих в большинстве случаев врожденные дефициты изотипов C4.

В табл. 2 суммированы случаи выявленных дефицитов С4А или С4В в сыворотках указанных выше больных. Приведенные в табл. 2 данные свидетельствуют о соответствии результатов выявления дефицитов изотипов С4А и С4В, полученных новыми вариантами иммуноферментного анализа в микропанели и на блоте, а также о полезности комбинации обоих методов для установления дефицита изотипа в спорных случаях, когда соотношение С4А/С4В близко к значениям 0,5 или 2. Очень высокие значения отношения С4А/С4В (сыворотки 6 и 13) или низкие (сыворотки 10 и 14) могут означать гомозиготный дефицит С4В или С4А, соответственно.

Таблица 2

Выявление дефицитов С4А и С4В иммуноферментным анализом в микропанели и на блоте после изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле

Номер сыворотки	С4А/С4В (микропанель)	С4А/С4В (блот)	Дефициты (микропанель)	Дефициты (блот)
1	0,89	0,90	–	–
2	0,44	0,40	С4А	С4А
3	0,36	0,39	С4А	С4А
4	0,51	0,42	С4А	С4А
5	0,93	0,97	–	–
6	3,26	2,99	С4В	С4В
7	1,90	2,17	С4В	С4В
8	0,26	0,32	С4А	С4А
9	2,01	4,64	С4В	С4В
10	0,01	0,17	С4А	С4А
11	1,56	1,97	С4В	С4В
12	2,15	1,98	С4В	С4В
13	2,88	2,72	С4В	С4В
14	0,01	0,08	С4А	С4А
15	0,27	0,24	С4А	С4А
16	0,04	0,03	С4А	С4А
17	0,28	0,30	С4А	С4А
18	0,65	0,68	–	–
19	1,70	3,19	С4В	С4В
20	1,20	1,54	–	–

Установленные иммуноферментным анализом в микропанели и на блоте дефициты в сыворотках по варьированию отношения количеств или активностей С4А/С4В ($\leq 0,5$ или ≥ 2 в случае дефицита С4А или С4В, соответственно) полностью совпадали.

2.2. Изучение активности компонента С4 комплемента у беременных в I триместре гестации

Для определения наличия дефицитов С4А и С4В изотипов компонента С4 комплемента у пациенток с различным течением беременности, было проведено определение относительной активности С4А, С4В и соотношение С4А/С4В у 12 здоровых беременных (контрольная группа) и у 30 беременных с невынашиванием в I триместре гестации (основная группа). Из них: у 18 беременных с начавшимся выкидышем, у которых беременность была сохранена (группа I); у 7 беременных с прервавшейся беременностью по типу самопроизвольного выкидыша (группа IIа) и у 5 беременных – с неразвивающейся беременностью (группа IIб).

Частота встречаемости врожденных дефицитов изотипов С4 компонента комплемента у обследованных беременных представлена в табл. 3.

Таблица 3

Частота встречаемости врожденных дефицитов изотипов компонентов С4А и С4В комплемента в сыворотке крови у обследованных беременных

Частота встречаемости дефицитов С4(%)	Группы обследованных (n=42)			
	Основная группа (n=30)			Контрольная группа (n=12)
	Группа I (n=18)	Группа IIа (n=7)	Группа IIб (n=5)	
Дефицит изотипа С4А	11,0	0	20,0	25,0
Дефицит изотипа С4В	17,0	29,0*	80,0**	17,0
Отсутствие дефицитов С4	72,0	71,0	0	58,0

Достоверные различия ($p < 0,05$) * - между IIа и I, контрольной группой; ** - между IIб и I, IIа и контрольной группой.

В результате проведенного исследования выявлено, что у здоровых беременных частота встречаемости врожденных дефицитов изотипов компонентов составила для С4А-25 % и для С4В-17%, что соответствует нормальной частоте встречаемости дефи-

цитов изотипов С4. Изучение частоты встречаемости врожденных дефицитов С4А и С4В компонентов С4 комплемента у женщин с невынашиванием беременности показало, что в группе пациенток с прервавшейся беременностью, процент распределения женщин с врожденными дефицитами отличался от процента пациенток с нормально протекающей беременностью или от тех, у кого беременность была сохранена.

У всех женщин (в 100% случаев) с неразвивающейся беременностью имел место дефицит одного из изотипов компонента С4.

Изучение функциональной активности отдельных изотипов не выявило четкой закономерности дефицита С4А в различных группах беременных. Частота дефицитов С4А у здоровых беременных составляла 25%, у беременных группы I – 11%, группы IIб – 20% и не отмечена у беременных группы IIа. В то же время выявлены значительные различия в частоте встречаемости дефицита С4В комплемента у беременных с различным течением гестационного процесса. Так, в группе женщин с начавшимся выкидышем, но сохраненной беременностью (группа I) частота дефицита компонента С4В комплемента не отличалась от группы здоровых беременных (контрольная группа) и составляла 17%. В группе пациенток с наличием самопроизвольного выкидыша (группа IIа) дефицит изотипа С4В наблюдался почти в 2 раза чаще, чем в контроле и в группе I беременных, и составлял 29% ($p < 0,05$). Наиболее выраженные изменения отмечены у женщин с неразвивающейся беременностью (группа IIб), у которых дефицит компонента С4В достигал 80%, что достоверно выше ($p < 0,05$), чем в других группах беременных.

Полученные результаты указывают на то, что СК человека выступает как сигнальная система, которая в условиях дефицита С4А или С4В (резкого преобладания одного изотипа по сравнению с другим изотипом) может приводить к патологическому протеканию беременности. Функциональное состояние изотипов С4 при этом выступает как лучший по сравнению с прочими компонентами СК индикатор неблагоприятного развития событий.

3. Дефициты С4А и С4В при антибактериальном и антитоксическом противодифтерийном иммунитете

Удобной моделью для изучения влияния дефицитов изотипов С4 на иммунный ответ организма человека оказалось изучение иммунного ответа на *Corynebacterium diphtheriae*, поскольку этот возбудитель дифтерии в инфицированном организме вызывает двойкий иммунный ответ – образование антитоксических антител (в том числе против дифтерий-

ного токсина) и образование антибактериальных антител (против полисахаридов клеточной стенки *C. diphtheriae*). Мы предположили, что индивидуумы, имеющие врожденный дефицит С4А или С4В, должны по-разному вырабатывать антитоксический и антибактериальный иммунные ответы. Врожденные дефициты С4А и С4В в популяции достаточно высоки – составляют около 15% каждый, поэтому можно было ожидать существенных различий в иммунном ответе.

Было проведено исследование ингибирующего действия этих антигенов на формирование С3-конвертазы из С4А и С4В и установлено (раздел 1.2). Кроме того, у детей было проведено определение содержания антитоксических и антибактериальных антител и сравнено с частотой встречаемости врожденных дефицитов изотипов С4А и С4В. В сыворотках крови здоровых детей в возрасте менее 10 лет было проведено иммуноферментное определение в микропанели антибактериальных (против вакцины Кодивак) и антитоксических (против дифтерийного анатоксина) антител, а также количественных соотношений изотипов С4А и С4В компонента С4 комплемента, по которым выявляли наличие дефицитов. Диапазон средних концентраций специфических противодифтерийных иммуноглобулинов было принято считать типичным для популяции. Если у исследуемого индивидуума уровень специфических антител в сыворотке крови выходит за пределы диапазона в сторону уменьшения концентрации, это может свидетельствовать об их дефиците, и, как следствие, вероятности недостаточной специфической защиты. Наоборот, если показатели концентрации антител выходят за пределы диапазона в сторону увеличения концентрации, то можно говорить об избыточном их синтезе и аномальном состоянии иммунной системы. Широкий диапазон выявленных показателей противодифтерийных антител был разделен на 3 группы: с средним, высоким и низким уровнями антител. Результаты показаны в табл. 4.

Как было показано выше (раздел 1.2), существенные различия в связывании с С4А и С4В проявлял Кодивак, связываясь в 6,5 раз лучше с С4В, поэтому можно было ожидать влияние дефицитов С4В на антибактериальный иммунный ответ. С другой стороны, можно было ожидать, что дефицит С4А будет существенен для антитоксического иммунного ответа, поскольку Кодивак связывается хуже с С4А, чем анатоксин. Действительно, дефициты этих изотипов различным образом влияют на высокий иммунный ответ, как это показано на рис. 3, построенному по данным табл. 4.

Таблица 4

Содержание антибактериальных и антитоксических антител и наличие дефицитов С4А и С4В в сыворотках крови здоровых детей

№№ сывороток	Содержание антител		Содержание изотипов*, % от контроля		Соотношение С4А/С4В	Дефициты**
	Антибактериальные	Антитоксические	С4А	С4В		
1	Среднее	Высокое	130	264	0,49	С4А
2	Среднее	Высокое	139	72	1,93	С4В
3	Среднее	Низкое	98	175	0.56	Нет
4	Среднее	Среднее	67	80	0,83	Нет
5	Среднее	Среднее	64	142	0,45	С4А
6	Среднее	Среднее	136	24	5,79	С4В
7	Среднее	Среднее	53	47	1,13	Нет
8	Среднее	Среднее	77	77	1,00	Нет
9	Среднее	Среднее	172	12	14,40	С4В
10	Среднее	Высокое	80	69	1,17	Нет
11	Среднее	Среднее	142	35	4,10	С4В
12	Высокое	Среднее	1	87	0,01	С4А
13	Высокое	Среднее	1	23	0,04	С4А
14	Низкое	Среднее	23	85	0,27	С4А
15	Высокое	Среднее	13	46	0,29	С4А
16	Среднее	Среднее	37	57	0,65	Нет
17	Низкое	Среднее	41	23	1,80	С4В
18	Высокое	Высокое	51	30	1,71	С4В
19	Низкое	Низкое	24	20	1,18	Нет
20	Высокое	Низкое	16	27	0,60	Нет
21	Низкое	Среднее	22	10	2,30	С4В
22	Высокое	Высокое	23	10	2,20	С4В

Примечания. * Определение изотипов С4 в микропанели разработанным методом;
 ** дефицит изотипа подтвержден хемилюминесцентным анализом на блоте.

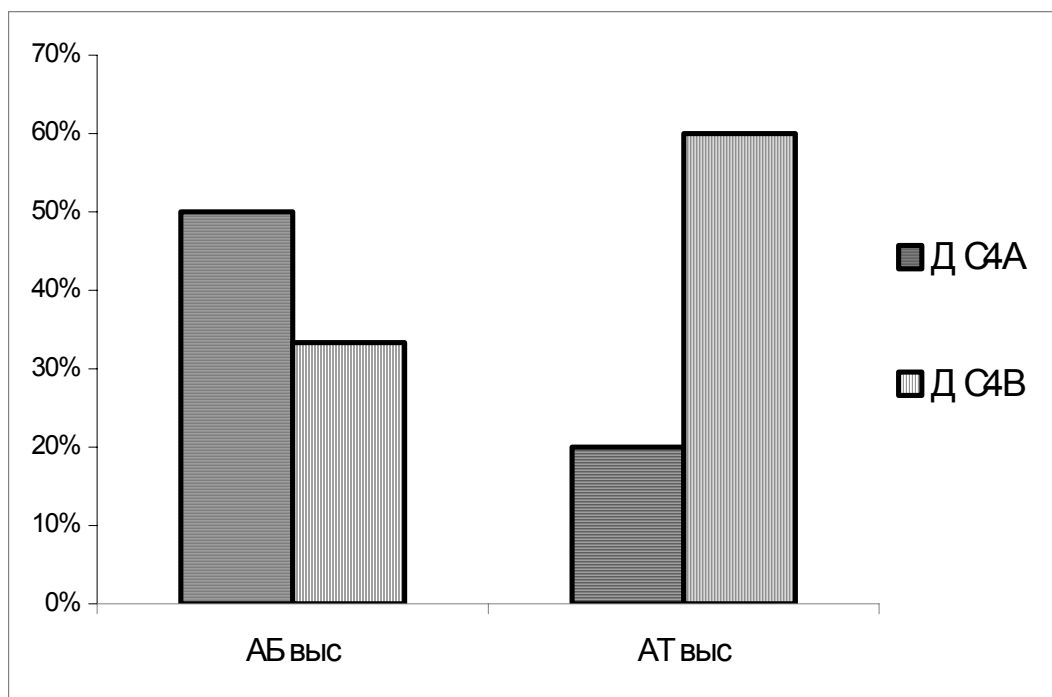


Рис. 3. Содержание дефицитов С4А (Д С4А) и С4В (Д С4В) при высоких антибактериальном (АБ выс) и антитоксическом (АТ выс) ответах ($p < 0,05$).

Приведенные выше результаты указывают на то, что высокий антибактериальный иммунный ответ наблюдается при относительно низком уровне дефицитов С4В, а высокий антитоксический ответ – при низком уровне дефицитов С4А.

ВЫВОДЫ

1. Разработан вариант иммуноферментного анализа функциональной активности изоформ С4А и С4В в микропанели, отличающийся от ранее применяемого тем, что используются антитела против С3 человека вместо антител против С4 человека. Метод позволяет выявлять дефициты С4А и С4В. На основе этого метода разработан способ определения констант ингибирования эффекторами связывания активированных С4А и С4В на мишени.
2. Разработаны варианты иммуноферментного анализа С4А и С4В на блоте, включающие их разделение изоэлектрофокусированием десалированной сыворотки в полиакриламидном геле, электро- и иммуноблоттинг и хемилюминесценцию пероксидазного конъюгата антител против С4 в режиме живого изображения. Определены интервалы варьирования изоформ С4А (рI 4,0–4,3) и С4В (4,58–4,65) человека.
3. Показано совпадение результатов по установлению дефицитов С4А или С4В в сыворотках человека методами, основанными на различиях в химической реакционной способности изоформ (иммуноферментный анализ в микропанели) и физико-химических свойств этих изоформ. и физико-химических свойств этих изоформ (иммуноферментный анализ на блоте).
4. Исследование наличия дефицитов изоформ компонента С4 комплемента может быть использовано в диагностике течения гестационного процесса и выделения групп повышенного риска женщин по невынашиванию беременности, особенно по типу неразвивающейся беременности.

5. Наличие дефицитов С4В в сыворотке крови может приводить к снижению уровня антибактериального иммунного ответа на *Corynebacterium diphtheriae*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лахтин В.М., Колесникова Е.В., **Лахтин М.В.**, Козлов Л.В., Семенов В.А. (2004) Трехблотовый хемилюминесцентный анализ высокогликозилированных рекомбинантных и эндогенных форм эритропоэтина человека в режиме живого изображения с использованием изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле, двух блотингов и проявления моноклональными антителами-I, биотинилированными антителами-II и конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена. В сб. *Химия и биохимия углеводов: Материалы III всероссийской школы-конференции*. Саратов: ООО «Ракурс», С.45.
2. Козлов Л.В., **Лахтин М.В.**, Лахтин В.М., Максимова И.Д. (2005) Частота врожденных дефицитов компонентов комплемента С4А и С4В при язвах желудка, двенадцатиперстной кишки и гастродуоденитов. *Гастроэнтерология (Санкт-Петербург)*, № 1-2. С. М61.
3. Алешкин В.А., Козлов Л.В., Савченко Т.Н., Новикова Л.И., Дондуп О.М., **Лахтин М.В.**, Лахтин В.М., Протопопова Л.О. (2006) Врожденные дефициты изоформ С4 компонента комплемента при невынашивании беременности. В сб. *Тезисы Международного конгресса "Современные технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний"*. Москва, С.
4. Макаров О.В., Савченко Т.Н., Козлов Л.В., Новикова Л.И., Дондуп О.М., Точиева М.Х., Протопопова Л.О., **Лахтин М.В.**, Лахтин В.М., Гора Н.В. (2006) Выявление врожденных дефицитов изоформ С4 компонента комплемента при нарушениях беременности и родов. В сб. *Тезисы VIII Российского форума "Мать и дитя"*. Москва, С.150.
5. Козлов Л.В., **Лахтин М.В.**, Лахтин В.М., Макарова С.И., Шмелева Е.А. (2007) Влияние дефицитов изоформ С4А и С4В компонента С4 комплемента на характер иммунного ответа на *Corynebacterium diphtheriae*. В сб. Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Т.3. М.: Сан-эпидмедия. С.44-45.
6. **Лахтин М.В.**, Козлов Л.В., Лахтин В.М., Дьяков В.Л. (2007) Выявление дефицитов изоформ С4А и С4В компонентов комплемента человека изоэлектрофокусированием и по различию в химической реакционной способности активированных форм. *Биоорган. Химия*, Т. 33; С.464-469.

Патенты

7. Козлов Л.В., **Лахтин М.В.**, Лахтин В.М., Дьяков В.Л. (2005) Способ определения функциональной активности компонента С4 (изотип С4А) комплемента человека: Патент на изобретение № 2253118 (Россия). Б.И. № 15.
8. Козлов Л.В., **Лахтин М.В.**, Лахтин В.М., Дьяков В.Л. (2005) Способ определения функциональной активности компонента С4 (изотип С4В) комплемента человека: Патент № 2253117 (Россия). Б.И. № 15.