

С.Н. Скопинская<sup>1</sup>, С.П. Ярков<sup>1</sup>, Е.Н. Храмов<sup>1</sup>, А.В. Анташев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГосНИИ биологического приборостроения, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова, Москва, Российская Федерация

## Разработка метода оценки общей активности комплемента на основе комплементзависимого иммунного лизиса липосом

**Цель исследования:** создать быстрый и воспроизводимый способ определения общей активности комплемента (total complement activity, TCA) в сыворотке крови человека и животных. **Материалы и методы:** получены устойчивые при хранении препараты липосом, поверхность которых сенсibilизирована 2,4-ДНФ гаптенами, а внутренний объем заполнен кальцием или сульфородамино 101. Исследованы закономерности иммунного комплементзависимого лизиса липосом в присутствии анти-2,4-ДНФ иммуноглобулинов и препаратов комплемента животных. **Результаты:** показано, что степень иммунного лизиса зависит от концентрации комплемента, что может быть использовано для определения уровня TCA. Исследование сывороток крови пациентов продемонстрировало корреляцию данных ( $r = 0,793$ ), полученных с помощью липосомной иммунолитической системы, и нефелометрического анализа с применением суспензии эритроцитов. **Выводы:** метод позволяет определять активность комплемента в сыворотках крови в широком диапазоне за временной интервал 15 мин без разделения компонентов реакции, что может быть полезно для определения уровня TCA у пациентов с различными заболеваниями и при проведении научных исследований.

**Ключевые слова:** иммунный анализ, липосомы, комплемент.  
(Вестник РАМН. 2014; 3–4: 24–30)

24

### Введение

Система комплемента относится к факторам врожденного иммунитета и включает ряд белков, действующих последовательно, каскадом, в котором каждый компонент катализирует активность следующего. В настоящее время определено около 20 сывороточных белков системы комплемента, а также факторы и активаторы/ингибиторы или регуляторные белки.

Изменение активности комплемента и его отдельных компонентов происходит при ревматоидных артритах, некоторых формах нефритов, системной красной

волчанке, вызывает повышение восприимчивости организма к рецидивирующим гнойным бактериальным инфекциям, что свидетельствует о важной роли системы комплемента для антибактериальной защиты организма и устранения нежелательных иммунных комплексов. Активация комплемента в очаге тканевого некроза при инфаркте миокарда, аутоиммунных реакциях в тканях может привести к повреждению клеток и тканей собственного организма [1–3]. Комплемент участвует в патологии, связанной с болезнью Альцгеймера [4], и в развитии заболеваний, ассоциированных с прионами [5].

S.N. Skopinskaya<sup>1</sup>, S.P. Yarkov<sup>1</sup>, E.N. Khramov<sup>1</sup>, A.V. Antashev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Scientific Research Institute of Biological Engineering, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

## The Development of Total Complement Activity Assay Based on Complement-Dependent Immune Liposome Lysis

**Background:** The purpose of work was development of a fast and reproduced procedure for measurement of the total complement activity (TCA) in human or animal blood serum. **Materials and methods:** Steady at storage liposomes preparations, which surface sensitized 2,4-DNP haptens, and the internal volume contains calcein or sulforhodamine 101 are obtained. Complement-dependent immune lysis of liposomes at presence of the anti-2,4-DNP immunoglobulines and complement preparations from animals are investigated. **Results:** It is shown that the degree of liposomes immune lysis depends on complement concentration in a wide range that can be used for definition of TCA level. Research of blood sera from patients has revealed correlation ( $r = 0,793$ ) between data received with the help of liposome immunolytic systems, and the data of nephelometric analysis with application of suspension sheep erythrocytes. **Conclusion:** The method allows to define total complement activity in blood serum in 15 minutes without separation of reaction components. This might be useful for measurement TCA level at patients with various diseases and realization of scientific researches.

**Key words:** immunoassay, liposomes, complement.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 3–4: 24–30)

Тесная связь активности комплемента с состоянием организма человека обуславливает необходимость определения в сыворотке крови общей активности комплемента (total complement activity, TCA). Определение титра комплементарной активности — хороший скрининговый метод для обнаружения дефицита комплемента.

Основным используемым в России и за рубежом методом регистрации TCA до настоящего времени является определение концентрации сыворотки крови, вызывающей 50% гемолиз клеток в стандартном препарате сенсibilизированных гемолизином бараньих эритроцитов (CH50) [6]. Недостатком данного подхода является нестабильность эритроцитов при хранении и при добавлении гемолизина, трудоемкость и длительность постановки реакции, включающей встряхивание проб, центрифугирование перед спектрофотометрической регистрацией гемолиза.

Для решения перечисленных проблем D·Orazlo и Rechnitz [7] предложили метод определения TCA с применением сенсibilизированных эритроцитов барана, внутренний объем которых содержал катионы триметилфениламмония (ТМФА<sup>+</sup>), и ионселективных электродов для регистрации лизиса теней. Чувствительность метода соответствовала спектрофотометрическому определению CH50, а воспроизводимость зависела от времени хранения и свойств отдельных партий нагруженных ТМФА<sup>+</sup> теней эритроцитов.

Для изучения комплементзависимого лизиса мембран Kinsky и соавт. [8] предложили использовать липосомы — искусственно формируемые структуры, представляющие собой замкнутые объемы, сформированные одним или несколькими липидными бислоями. Существуют различные способы получения липосом, поверхность которых может быть сенсibilизирована антителами (АТ) либо антигенами (АГ), а внутренний объем заполнен маркерными молекулами, по выходу которых судят о протекании лизиса липосом. При этом используют маркерные молекулы различной химической природы (ферменты и их субстраты, флуоресцентные соединения, ионы, красители, спиновые метки) и приборы для их регистрации.

Известно, что лизис сенсibilизированных АГ липосом специфичными АТ в присутствии комплемента пропорционален числу образовавшихся комплексов АГ–АТ–комплемент и может быть использован для определения каждого компонента комплекса. Применение липосомного иммуноанализа для определения концентрации АГ (гаптенов) и специфичных АТ суммировано в обзорах [9, 10]. Данные, свидетельствующие о возможности использования иммунного лизиса липосом для определения TCA, немногочисленны [11–13].

**Цель исследования:** разработать способ определения TCA в сыворотках крови животных и человека с использованием иммунолитической липосомной системы, включающей липосомы с инкапсулированным флуоресцентным маркером, в липидный бислой которых встроены 2,4-ДНФ группы; оценить стабильность препаратов липосом и возможности их использования для определения TCA в образцах сывороток крови, полученных от больных, и в сыворотках крови животных, выпускаемых промышленностью для клинико-диагностических исследований.

## Материалы и методы

### Материал для исследования

В работе использовали холестерин, трис(гидроксиметил)аминометан (трис) и дицетилфосфат Serva (Германия), кальцеин, сульфородамин 101, дипальмитоилфосфа-

тидилхолин (ДПФХ), 2,4-динитрофенил-фосфатидилэтаноламин (2,4-ДНФ-ФЭА), тритон X-100, кроличью сыворотку к 2,4-ДНФ, содержащую 1,6–1,7 мг/мл анти-ДНФ-АТ (Sigma, США), 2,4-динитрофенил-ε-капроилдипальмитоил-фосфатидилэтаноламин (2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА; Avanti Polar Lipids, США). Для тонкослойной хроматографии применяли пластины Kieselgel 60 (Merck, Германия). Кальцеин очищали на колонке с сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция). Сульфородамин 101 применяли без дополнительной очистки.

Также в работе использовали лиофильно высушенные препараты комплемента морской свинки (Имунопрепарат, Россия) и кролика, полученные А.Н. Мац в НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва). Сыворотки крови человека были получены при участии А.В. Анташева в ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова. Остальные реактивы были отечественного производства с чистотой х.ч. (химически чистые) или ч.д.а. (чистые для анализа).

### Методы исследования

Липосомы получали по методу обращения фаз [14] из смеси липидов ДПФХ / холестерин / дицетилфосфат / 2,4-ДНФ-ФЭА или 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА в мольном соотношении 2,0:1,5:0,22:0,2. В качестве маркера для регистрации лизиса липосом использовали сульфородамин 101 (100 мМ) или кальцеин (175 мМ).

Для удаления невключившегося маркера проводили центрифугирование липосомной суспензии при 150 000 г на ультрацентрифуге L8-70M (Beckman, США). Липосомы суспендировали в трис-солевом буфере (ТСБ), содержащем 20 мМ трис-НСl и 150 мМ NaCl, pH = 7,5.

Постановка реакции иммунного лизиса описана ранее [15], реакционная смесь содержала 20 нмоль суммарного липида липосом, реакция проводилась при 37 °С. Расчет величины иммунного лизиса (А) осуществляли по формуле:

$$A = (F_{им.} - F_{АТ} - F_{к.} - F_{ф.}) \times 100\% / (F_{об.} - F_{ф.}),$$

где  $F_{им.}$  соответствует интенсивности флуоресценции образца, содержащего липосомы, АТ и комплемент;  $F_{АТ}$  — флуоресценция образца, содержащего липосомы и АТ;  $F_{к.}$  — флуоресценция образца, содержащего липосомы и комплемент;  $F_{ф.}$  — фоновая флуоресценция липосом в ТСБ;  $F_{об.}$  — общая флуоресценция реакционной смеси после разрушения липосом 1% раствором тритона X-100.

Для оценки сохранности структур липосом во времени определяли количество внешнего маркера, которое рассчитывали как:

$$F_{ф.} \times 100\% / F_{об.},$$

где  $F_{ф.}$  и  $F_{об.}$  — флуоресценция пробы, содержащей липосомы до и после их разрушения детергентом, соответственно.

Эффективность включения маркера (EN) определяли по формуле:

$$EN = 100\% \times (F_{об.} - F_{ф.}) / F_{об.}, \text{ как описано в работе [16].}$$

Внутренний объем липосом ( $V_i$ ) рассчитывали по формуле:

$$V_i = (V \times C) / (100\% \times B),$$

где  $V$  — объем водного раствора маркера;  $C$  — суммарное включение маркера в препарат липосом, %;  $B$  — количество липида в препарате липосом в молях.

Измерение интенсивности флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Perkin Elmer-3000 (США) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Параметры настройки флуориметра при измерении различных образцов были идентичны. Флуоресценцию кальцеина регистрировали при длинах волн эмиссии и возбуждения равных 520 и 493 нм. На пути света эмиссии дополнительно устанавливали светофильтр ЖС-18. Флуоресценцию сульфородамина 101 определяли при длинах волн эмиссии и возбуждения равных 620 и 585 нм. На пути света эмиссии устанавливали светофильтр КС-11.

Электронную микроскопию проводили на приборе JEV 100CX (JEOL, Япония). Образцы липосом в ТСБ наносили на медные сеточки, покрытые формваром, и фиксировали 2% раствором уранилацетата на воде. Препараты просматривали при инструментальном 8000-кратном увеличении.

Липидный фосфор определяли методом V.E. Vaskovsky и соавт. [17]. Мембранные липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии в смеси хлороформ / метанол / вода (70:30:5, объемные части). Для проявления пятен применяли фосфомолибденовую кислоту (реагент на фосфолипиды) и нингидриновый реагент для обнаружения свободных аминокрупп.

26 **Статистическая обработка данных**

Статистический анализ результатов исследования осуществляли путем расчета среднего арифметического из величин измерений (X) и вычисления среднеквадратического отклонения (S). Определяли коэффициент вариации (CV) по формуле:

$$CV = (S/X) \times 100\%.$$

Для построения экспериментальных кривых и вычисления параметров линейных регрессий применяли программу Origine 6.1 (Origine Lab Corporation, США).

**Результаты**

**Получение и характеристика липосомного реагента.** В качестве антигенного материала для сенсibilизации липосом использовали синтетический гаптен 2,4-ДНФ, который не встречается в природе, что исключает вероятность присутствия в исследуемых образцах сывороток крови человека или животных АТ к нему и последующего неконтролируемого лизиса липосом. Для введения 2,4-ДНФ в мембрану применяли конъюгаты 2,4-ДНФ-ФЭА или 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА, доля которых в мембранах составила 10 мол.% от ДПФХ. С целью повышения стабильности липосомных препаратов в качестве основного фосфолипида при формировании липосом использовали ДПФХ.

На хроматограмме липидного экстракта липосом, обработанной фосфомолибденовой кислотой, были обнару-

жены пятна, соответствующие ДПФХ, холестерину, дицетилфосфату и 2,4-ДНФ-ФЭА или 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА, что свидетельствует о включении липидных конъюгатов ДНФ в липосомы. На аналогичной хроматограмме, обработанной нингидриновым реагентом, не детектированы вещества с положительной реакцией на нингидрин, что говорит об отсутствии деградации липидных конъюгатов ДНФ в процессе получения липосом.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что из липидной смеси, включающей ДПФХ, холестерин и дицетилфосфат, в присутствии любого 2,4-ДНФ-конъюгата могут быть сформированы липосомы с инкапсулированным сульфородамино 101 или кальцеином. Основные физико-химические параметры были одинаковыми для всех исследованных препаратов.

Эффективность включения кальцеина в липосомы составила 64% и имела несколько более высокие значения (74–88%) для липосом с сульфородамино 101, которые существенно не изменялись при хранении в течение 6 мес (время наблюдения).

Определение размеров липосом, проведенное для большого числа частиц (n =305) по фотографиям, показало, что препарат липосом содержит частицы с размерами от 40 до 280 нм. Около 65% липосом имели диаметр <200 нм.

**Изучение реакции комплементзависимого лизиса липосом, содержащих 2,4-ДНФ.** Добавление к липосомам, сенсibilизированным конъюгатами 2,4-ДНФ, комплемента и сыворотки, содержащей анти-ДНФ-иммуноглобулины, вызывало лизис липосом и сопровождалось выходом в объем реакционной смеси инкапсулированного в липосомы маркера. Степень иммунного лизиса зависела от количества введенных АТ (рис. 1). В отсутствии анти-ДНФ-АТ комплемента или при добавлении в инкубационную смесь с антисывороткой и липосомами прогретого при 56 °С комплемента выход маркера не был зарегистрирован, что указывает на специфичность иммунного ответа, а также на стабильность в процессе проведения реакции липосомного реагента по отношению к компонентам сывороток крови. Даже при введении в инкубационную смесь 40 мкл препарата комплемента морской свинки в отсутствие антисыворотки выход маркеров не превысил 5%, что важно для разработки метода определения комплементарной активности.

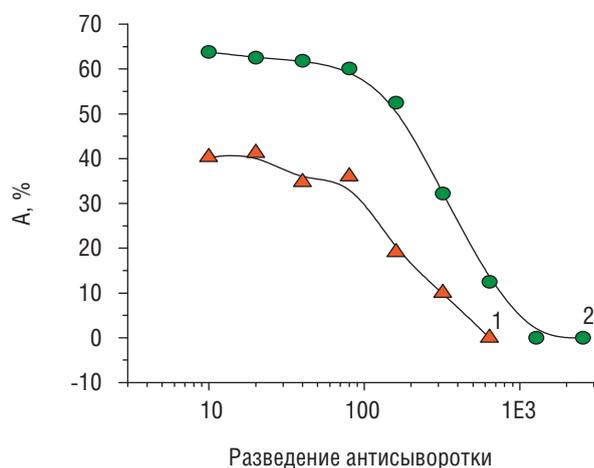
Реакция иммунного лизиса липосом с 2,4-ДНФ-конъюгатами развивалась очень быстро, в особенности это касалось липосом с 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА (рис. 2), и уже через 1 мин степень иммунного лизиса липосом в опытах с препаратами, сенсibilизированными 2,4-ДНФ- и 2,4-ДНФ-капроильными конъюгатами, составила 33 и 50% максимального иммунного лизиса, который был зарегистрирован через 15 мин инкубации.

**Разработка теста определения ТСА и оценка активности комплемента в образцах сывороток крови.** В качестве оптимальных условий проведения иммунной реакции были выбраны 20 нмоль липида липосом, антисыворотка

Таблица 1. Физико-химические и иммунные свойства липосом, сенсibilизированных 2,4-ДНФ-производными ФЭА и ДПФЭА

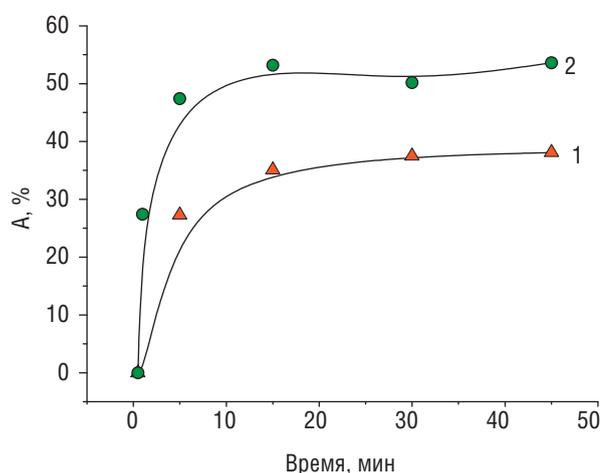
Гаптен	Прирост флуоресценции образца после разрушения детергентом, Fоб./Fф. (раз)	Vi, л/моль	Разведение сыворотки в точке максимального иммунного лизиса	Максимальный иммунный лизис, %
*2,4-ДНФ-ФЭА	2,82	0,47	1:10–1:20	30,5–41,2
**2,4-ДНФ-ФЭА	3,85–6,95	0,29–0,56	1:10–1:40	28,3–44,8
*2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА	2,83	0,22	1:10–1:80	54,8–67,6
**2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА	8,30	0,67	1:10–1:160	27,4–54,4

Примечание. \* — липосомы с кальцеином, \*\* — липосомы с сульфородамино 101.



**Рис. 1.** Зависимость иммунного лизиса липосом, сенсibilизированных 2,4-ДНФ-производными липидов, от содержания антисыворотки.

*Примечание.* А — величина иммунного лизиса. Инкубационная смесь содержала липосомы, сенсibilизированные 2,4-ДНФ-ФЭА (1) или 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА (2), комплемент морской свинки и антисыворотку к 2,4-ДНФ.



**Рис. 2.** Зависимость иммунного лизиса липосом, сенсibilизированных 2,4-ДНФ-производными ДПФХ, от времени инкубации. *Примечание.* А — величина иммунного лизиса. Инкубационная смесь содержала липосомы, сенсibilизированные 2,4-ДНФ-ФЭА (1) или 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА (2), комплемент морской свинки и антисыворотку к 2,4-ДНФ.

**Таблица 2.** Результаты определения иммунного лизиса липосом для различных разбавленных препаратов комплемента

Разведение препарата комплемента	Иммунный лизис, %			
	Источник комплемента — сыворотка крови морской свинки		Источник комплемента — сыворотка крови кролика	
	Препарат № 1	Препарат № 2	Препарат № 1	Препарат № 2
1:100	8,1±0,6	15,1±0,9	-	-
1:80	-	19,7±1,5	-	-
1:50	17,3±1,2	-	-	-
1:40	-	39,0±2,4	-	-
1:25	35,6±2,9	-	-	-
1:20	-	40,9±2,3	-	-
1:10	51,4±3,8	52,7±2,2	12,1±0,9	12,0±0,8
1:8	-	-	17,6±1,1	18,4±1,2
1:5	-	-	23,8±1,9	-
1:4	50,0±2,1	54,6±2,9	36,5±2,9	35,7±2,1
1:2	-	-	35,2±2,6	40,4±2,8

к 2,4-ДНФ в разведениях 1:20–1:40 и 1:80–1:160 (обеспечивающая максимальный иммунный ответ) в опытах с сенсibilизированными 2,4-ДНФ-ФЭА и 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА липосомами, соответственно (см. табл. 1), 15 мин инкубации при 37 °С, объем инкубационной смеси 100 мкл, объем препарата комплемента 20 мкл.

Степень иммунного лизиса липосом при оптимальном содержании антисыворотки и времени инкубации в определенном диапазоне концентраций комплемента четко зависела от количества введенного в инкубационную смесь препарата комплемента (табл. 2). Обращают на себя внимание различия в диапазоне рабочих концентраций препаратов комплемента кролика и морской свинки. Сыворотка крови морской свинки была функционально активной при более высоких разведениях, чем сыворотка крови кролика, что говорит о более высокой ее ТСА.

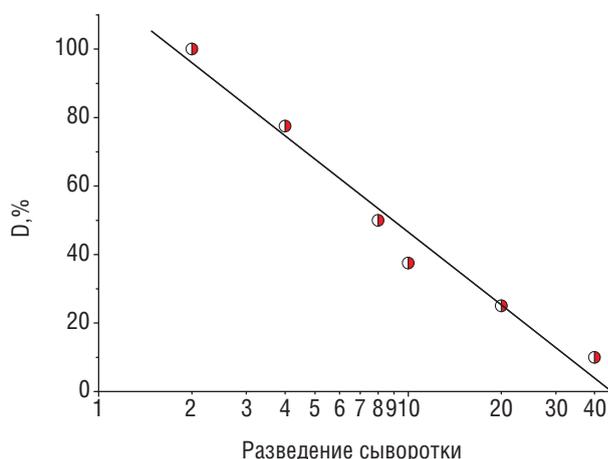
Как уже было отмечено выше, липосомы, полученные с использованием ДПФХ, были устойчивы к действию препаратов комплемента и антисыворотки, что позволяет упростить проведение анализа, исключив постановку контролей на неспецифическое действие антисыворотки (в рабочем разведении) и исследуемого на активность

комплемента образца (начиная с разведения 1:2). Способ расчета величины иммунного лизиса липосом (D) в этом случае можно проводить по формуле:

$$D = (F_{им.} - F_{ф.}) \times 100\% / (F_{им*} - F_{ф.}),$$

где  $F_{им.}$  соответствует интенсивности флуоресценции образца, содержащего липосомы, антисыворотку (в рабочем разведении) и комплемент (в конкретном разведении);  $F_{им*}$  — флуоресценции образца, содержащего липосомы, антисыворотку (в рабочем разведении) и комплемент (в разведении, обеспечивающем максимальный иммунный ответ);  $F_{ф.}$  — фоновая флуоресценция липосом в буфере. За 100% принимают флуоресценцию образца, соответствующую максимальному иммунному лизису липосом.

По аналогии с гемолитическим тестом, основанным на определении литической единицы (СН50) как количества комплемента, необходимого для 50% гемолита эритроцитов, для характеристики ТСА в системе с использованием липосом мы предлагаем определять липолитическую единицу как количество исследуемого на активность комплемента образца (например, сыворотки крови), необходимое для получения 50% макси-



**Рис. 3.** Зависимость иммунного лизиса липосом от разведения сыворотки крови человека.

*Примечание.* D — величина иммунного лизиса липосом. Инкубационная смесь содержала липосомы, сенсibilизированные 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА, сыворотку крови человека и антисыворотку к 2,4-ДНФ. За 100% принимали максимальный иммунный лизис липосом. Параметры линейной регрессии:  $Y = 1,17 - 70,76 \times X$  ( $n = 6$ ;  $r = -0,986$ ).

28

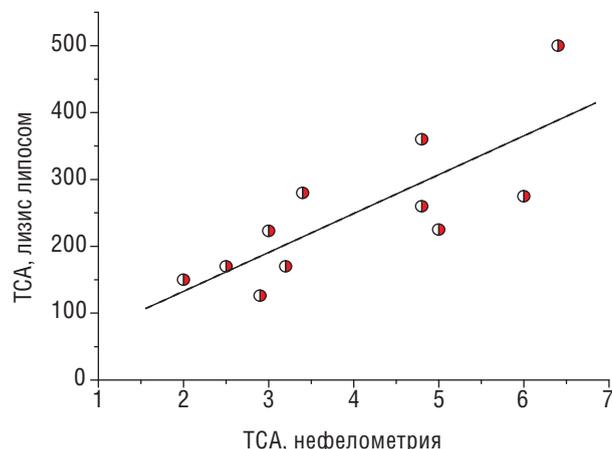
мального иммунного ответа липосомной системы, для чего строим график зависимости величины иммунного лизиса липосом от разведения исследуемой сыворотки (рис. 3) и определяем разведение, обеспечивающее 50% иммунный лизис. ТСА в липосомной иммунолитической системе определяют как число липолитических единиц в 1 мл исследуемого образца по формуле:

$$TCA = 1000 \times E / 20,$$

где 1000 соответствует 1000 мкл (1 мл), E — разведение, обеспечивающее 50% лизис от максимального иммунного ответа, 20 — объем анализируемой пробы сыворотки крови (20 мкл). ТСА выражают в условных единицах на 1 мл сыворотки. Например, если 50% лизис липосом от максимального иммунного ответа получен при разведении сыворотки крови в 8 раз, в этом случае  $TCA = 1000 \times 8 / 20$ , что соответствует 400 ед./мл.

При помощи предложенного подхода были определены ТСА препарата комплемента морской свинки и двух препаратов комплемента кролика, которые составили  $2045 \pm 59$  ед./мл ( $n = 9$ ,  $CV = 2,9\%$ ) для комплемента морской свинки и  $151 \pm 7$  ед./мл ( $n = 3$ ,  $CV = 4,6\%$ ) и  $292 \pm 5$  ед./мл ( $n = 3$ ,  $CV = 1,7\%$ ) для комплемента кролика. Определение ТСА для лиофильно высушенного препарата комплемента морской свинки проводили с интервалами в несколько месяцев. Ампулы с препаратом комплемента одной серии вскрывали через определенные промежутки времени, содержимое растворяли с последующим определением ТСА. Исходные значения ТСА препарата составили  $2047 \pm 104$  ед./мл ( $n = 4$ ,  $CV = 5,1\%$ ), через 4 мес —  $2130 \pm 128$  ед./мл ( $n = 3$ ,  $CV = 6,0\%$ ), через 7 мес —  $2030 \pm 137$  ед./мл ( $n = 3$ ,  $CV = 6,7\%$ ) и через 8 мес —  $2000 \pm 102$  ед./мл ( $n = 3$ ,  $CV = 5,1\%$ ).

Используя тот же подход, определили ТСА в свежеполученных сыворотках крови человека. Параллельно в тех же пробах активность комплемента оценивали нефелометрически, регистрируя время, необходимое для 50% разрушения сенсibilизированных гемолизином эритроцитов. Анализ проб сывороток крови от 11 пациентов продемонстрировал корреляцию ( $r = 0,793$ ) результа-



**Рис. 4.** Корреляция данных определения ТСА в сыворотке крови человека, полученных нефелометрически и с помощью липосомной иммунолитической системы.

*Примечание.* ТСА — общая активность комплемента. Параметры линейной регрессии:  $Y = 16,37 + 58,16 \times X$  ( $n = 11$ ;  $r = 0,793$ ). Значения ТСА приведены в условных единицах.

тов, полученных двумя независимыми методами (рис. 4). Величины ТСА, зарегистрированные нами с помощью липосомной системы, в исследованных образцах сывороток крови человека изменялись от достаточно высоких ( $TCA = 500$  ед./мл) до низких (126 ед./мл) значений. Также с помощью липосом проведено определение ТСА в сыворотках крови некоторых пациентов в процессе их лечения. Например, до операции ТСА сыворотки крови «А» составила 126, а после операции — 170 ед./мл, ТСА сыворотки крови «В» до лечения была равна 150, после — 223 ед./мл, что коррелирует с данными, зарегистрированными нефелометрическим методом, и подтверждает адекватность получаемых с использованием липосомного теста результатов.

### Обсуждение

Представленные данные свидетельствуют о возможности создания метода определения ТСА в сыворотках крови, основанного на опосредованном комплементом иммунном лизисе липосом. Показано его использование для определения комплементарной активности в клинических образцах сывороток крови человека, а также в промышленно выпускаемых препаратах комплемента. При создании липосомного реагента в качестве флуоресцентного маркера можно применять как кальцеин, так и сульфородамин 101. Для сенсibilизации липосом можно использовать различные 2,4-ДНФ-производные ФЭА. Иммунная реакция с липосомами из 2,4-ДНФ-кап-ДПФЭА характеризовалась более высокими значениями титров антисыворотки, что делает тест-систему на основе липосом с данным гаптеном более экономичной за счет использования меньшего количества дорогостоящего препарата антисыворотки. Возможное объяснение такой закономерности состоит в том, что АГ-детерминанты ДНФ-ФЭА, располагающиеся в непосредственной близости к поверхности мембран, менее доступны для АТ, чем отдаленные от мембраны за счет «ножки» антигенных участков капроильного фрагмента ДНФ-кап-ДПФЭА, поэтому полученные в присутствии этого соединения

липосомы более эффективно участвуют в иммунном лизисе.

Липосомный реагент был устойчив к хранению при 4–8 °С до 6 мес (срок наблюдений), а также к неспецифическому действию компонентов сывороток. Этот факт позволяет существенно упростить процедуру определения иммунного лизиса липосом и расчет его величины, исключая постановку контролей на неспецифическое действие антисыворотки и комплемента по крайней мере при анализе разведенных образцов. Использование липосом с инкапсулированным флуоресцентным маркером, в отличие от классического гемолитического теста с применением суспензии эритроцитов, позволяет проводить регистрацию его выхода сразу после проведения реакции без предварительного центрифугирования каждой пробы. Кроме того, липосомы представляют собой более мелкие, чем эритроциты, частицы, не оседающие в процессе постановки реакции, которая протекает быстро, в течение 15 мин, вместо 60-минутной реакции с эритроцитами.

Определение ТСА с использованием липосом и регистрации 50% иммунного лизиса кажется нам более приемлемым, чем метод, описанный Bowden и соавт. [12] и основанный на построении калибровочной кривой для стандартного препарата комплемента с известной активностью, которую для более точного анализа необходимо строить перед каждым измерением. В отличие от подхода, предложенного ранее в работе Masaki и соавт. [11], где максимальный иммунный лизис составил 100%, максимальный иммунный ответ полученных нами липосом, сенсibilизированных 2,4-ДНФ-производными, не превышал 70%. Указанные различия могут быть связаны со свойствами препаратов липосом (например, с их размерами), что влияет на величину максимального иммунного лизиса, а также со свойствами препаратов АТ (антисыворотки или изолированных иммуноглобулинов), с химической структурой использованного для сенсibilизации липосом АГ. При определении ТСА мы предлагаем регистрировать количество комплемента, вызывающее 50% максимального иммунного ответа. Этот подход нам кажется более правильным, тем более что максимальный иммунный лизис может изменяться от партии к партии липосом.

Значения коэффициента вариации (CV = 1,7–6,7%), полученные при оценке ТСА лиофильно высушенных препаратов комплемента морской свинки и кролика, говорят о хорошей воспроизводимости результатов анализа при его проведении в течение дня и через большие промежутки времени, несмотря на то, что для определения ТСА в разные месяцы было использовано 4 партии липосомного реагента, которые различались по величине максимального иммунного ответа, и 2 препарата антисыворотки. Представленные данные также подтверждают правильность выбранного подхода определения вели-

чины ТСА с учетом 50% от максимального иммунного лизиса.

Исследование сывороток крови пациентов продемонстрировало корреляцию данных ( $r = 0,793$ ), полученных с помощью иммунолитической системы, и нефелометрического анализа с применением суспензии эритроцитов. Активность комплемента в сыворотках крови с использованием липосом можно определять в широком диапазоне, в т.ч. в диапазоне значений ниже нормы, что важно для оценки состояния пациентов со сниженным иммунным статусом и влияния применяемых методов лечения. В отличие от подходов определения ТСА, описанных ранее [11, 12], предложенный метод является более быстрым, с меньшим объемом реакционной смеси (100 мкл вместо 250–1250 мкл), что делает его экономичным как по расходу исследуемого образца, так и компонентов иммунной реакции (20 нмоль в нашем методе вместо 150–600 нмоль липида липосом в других работах). Перечисленные выше характеристики липосомной иммунолитической системы для регистрации ТСА, а также полученные при анализе сывороток крови данные свидетельствуют о перспективности метода.

В дальнейшем метод с использованием липосом может быть применен для более широкого и детального анализа ТСА у пациентов с различными заболеваниями, а также динамики его изменения в процессе лечения. Полученные данные позволяют оценить эффективность используемых при лечении средств и подходов и установить корреляцию между их влиянием на иммунную систему и состоянием организма пациента в целом.

По нашему мнению, является перспективным применение разработанного подхода для изучения влияния биологически активных соединений (иммунокорректоров, антибиотиков и др.) на систему комплемента *in vitro* и отбора наиболее эффективных препаратов. К числу таких соединений нужно отнести ингибиторы и регуляторные молекулы системы комплемента, которые используют в терапии и при трансплантации органов и тканей, и которые снижают вероятность их отторжения в организме хозяина.

## Заключение

На основе препаратов липосом, поверхность которых сенсibilизирована 2,4-ДНФ гаптенами, а внутренний объем заполнен флуоресцентным красителем, предложен быстрый, простой и экономичный метод определения ТСА в образцах сывороток крови человека. Метод может быть применен для определения ТСА в сыворотке крови больных с целью диагностики заболеваний и их лечения, а также для выполнения научных исследований.

*Авторы выражают благодарность А.Н. Мац за предоставленные препараты комплемента кролика.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Валпорт М. Иммунология. Пер. с англ. Под. ред. А. Ройта, Дж. Бростоффа, Д. Мейла. М.: Мир. 2000. С. 59–81.
2. Figueroa J.A., Densen P. Infection diseases associated with complement deficiencies. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4: 359–395.
3. Morgan B.P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1995; 32: 265–298.
4. Rogers J., Cooper N.R., Webster S. et al. Complement activation by  $\beta$ -amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 10016–10020.
5. Klein M.A., Kaeser P.S., Schwarz P. et al. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat. Med.* 2001; 7: 488–492.
6. Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. Под. ред. А. Ройта, Дж. Бростоффа, Д. Мейла. М.: Мир. 2000. С. 527–546.
7. D'Orazio P., Rechnitz G.A. Ion electrode measurements of complement and antibody levels using marker-loaded sheep red blood cell ghosts. *Anal. Chem.* 1977; 49 (13): 2083–2086.
8. Naxby J.A., Gotze O., Muller-Eberhard H.J., Kinsky S.C. Release of trapped marker from liposomes by the action of purified complement components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1969; 64: 290–298.

9. Скопинская С.Н., Ярков С.П. Липосомальный иммуноанализ. *Иммунология*. 1996; 2: 6–12.
10. Rongen H.A.H., Bult A., van Bennekom W.P. Liposomes and immunoassays. *J. Immunol. Meth.* 1997; 204: 105–133.
11. Masaki T., Okada N., Yasuda R., Okada H. Assay of complement activity in human serum using large unilamellar liposomes. *J. Immunol. Meth.* 1986; 123: 19–24.
12. Bowden R.W., Rising M., Akot G. et al. Homogeneous, liposome-based assay for total complement activity in serum. *Clin. Chem.* 1986; 32 (2): 275–278.
13. Tatsu Y., Yamamura S., Yoshikawa S. Fluorescent fiber-optic immunosensing system based on complement lysis of liposome containing carboxyfluorescein. *Biosensors & Bioelectronics*. 1992; 7: 741–745.
14. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1978; 75 (9): 4194–4198.
15. Скопинская С.Н., Ярков С.П., Храмов Е.Н., Злобин Е.Н. Сульфородамин 101 — новый эффективный маркер в липосомальном иммуноанализе. *Вестник РАМН*. 2000; 10: 19–24.
16. Ohsawata T., Miura H., Harada K. Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposomes formed by the freeze-thawing method. *Chem. Pharm. Bull.* 1985; 33 (9): 3945–3952.
17. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis. *J. Chromatograph.* 1975; 114: 129–141.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Скопинская Светлана Николаевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела спектральных методов анализа ГосНИИ биологического приборостроения

**Адрес:** 125424, Москва, Волоколамское ш., д. 75, **тел.:** (495) 491-86-83, **e-mail:** diasol@dol.ru

**Ярков Сергей Петрович**, доктор биологических наук, начальник отдела спектральных методов анализа ГосНИИ биологического приборостроения

**Адрес:** 125424, Москва, Волоколамское ш., д. 75, **тел.:** (495) 491-86-83, **e-mail:** diasol@dol.ru

**Храмов Евгений Николаевич**, доктор технических наук, профессор, директор ГосНИИ биологического приборостроения

**Адрес:** 125424, Москва, Волоколамское ш., д. 75, **тел.:** (495) 491-73-72, **e-mail:** niibp@dol.ru

**Анташев Артем Викторович**, кандидат медицинских наук, врач-лаборант ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова, врач-лаборант Клинической больницы № 1 Управления делами Президента РФ

**Адрес:** 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1, **тел.:** (495) 491-35-05, **e-mail:** artem72antashev@mail.ru