

УДК 577.15.08
©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ, КОЛИЧЕСТВА C1 ИНГИБИТОРА И АУТОАНТИТЕЛ К НЕМУ КАК ИНСТРУМЕНТ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОТЕКОВ

С.С.Андина, Л.В.Козлов, В.Л.Дьяков

ГУ Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского,
125212 Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, факс (095)452-18-30;
эл. почта: L.V.Kozlov@mtu-net.ru

Этиология ангионевротических отеков (а отсюда и схема их лечения) может быть различна. В целом ангионевротические отеки делятся на четыре категории: наследственные ангионевротические отеки (НАО), приобретенные (АО), аллергии и васкулиты. Установить причину наследственных и приобретенных отеков позволяют анализы функциональной активности компонентов комплемента, количества и активности C1 ингибитора, наличия (или отсутствия) аутоантител к C1 ингибитору. Сорбция очищенных ферментов активированного субкомпонента C1s или плазмина на микропанелях позволяет специфически связывать в лунках планшета C1 ингибитор из сыворотки крови и с помощью конъюгата антител против C1 ингибитора с пероксидазой хрена определять количество связавшегося функционально активного C1 ингибитора. Дополнение этой тест-системы иммуноферментной системой для определения количественного содержания C1 ингибитора в сыворотке, а также системами для определения IgG, IgA и IgM аутоантител против C1 ингибиторов завершает создание необходимого набора методов дифференциальной диагностики.

Ключевые слова: система комплемента, C1 ингибитор, активность, дефициты, аутоантитела, отеки.

ВВЕДЕНИЕ. Ингибитор сериновых протеиназ C1 ингибитор участвует в регуляции многих ферментов плазмы крови, таких как C1r, C1s комплемента, калликреина калликреин-кининовой системы, а также факторов свертывающей и противосвертывающей систем - XIa, XIIa, XIIf и плазмина (фибринолизина) [1]. Дефицит этого ингибитора приводит к периодическим отекам, затрагивающим, главным образом, конечности, лицо, гортань и слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта. Недостаточная активность ингибитора ведет к неуправляемой активации классического пути комплемента, что приводит к снижению содержания компонентов комплемента (прежде всего C4 и C2) [1].

Дефицит C1 ингибитора может быть либо наследственным (наследственный ангионевротический отек, НАО), либо приобретенным [1,2]. НАО бывает двух типов. Тип 1, к которому относятся 85% больных, обусловлен низкими концентрациями C1 ингибитора. Остаточные 15% больных принадлежат типу 2 НАО, при котором продуцируется C1 ингибитор с пониженной или отсутствующей функциональной активностью, но в нормальной или повышенной концентрации [3]. НАО сравнительно редкое заболевание (1 случай на 10000-50000 человек) [4], а приобретенная форма, обусловленная возникновением антител (АТ) к C1 ингибитору, встречается еще в 10 раз реже. Дифференциальная

С1 ИНГИБИТОР В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОТЕКОВ

диагностика отеков важна из-за высокой смертности при этом заболевании в отсутствие необходимой терапии, выбор которой обусловлен знанием точного диагноза. В настоящее время имеются достаточно эффективные методы лечения, в частности с применением андрогенов (даназола), приводящих к повышению концентраций С1 ингибитора в крови, благодаря дерепрессии второго, как правило, нормального гена [5].

Работа посвящена созданию удобных иммуноферментных методов определения количества и функциональной активности С1-ингибитора, а также наличия аутоантител к нему, что позволит решить проблему дифференциальной диагностики отеков.

МЕТОДИКА. Исследованию на наличие врожденных или приобретенных дефицитов С1 ингибитора были подвергнуты сыворотки крови 40 больных с отеками, предоставленные Институтом иммунологии МЗ РФ (12 человек) и Консультационно-диагностическим центром ГУ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (28 больных).

В работе использовали 96-луночные плоскодонные микропанели для иммуноферментного анализа отечественного производства (ГОСНИИМЕДПОЛИМЕР, г. Москва), твин-20 ("Sigma", США), пероксидазу хрена НПО "Биохимреактив" (г. Олайне, Латвия), остальные реактивы - отечественного производства не ниже ч.д.а.

Конъюгаты козьих антител к иммуноглобулинам G, A, M человека получены в ГУ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.

Получение высокоочищенного С1 ингибитора из сыворотки крови человека осуществляли методами, аналогичными, описанным в работе [6].

Получение кроличьих антител к С1 ингибитору. 1 мг высокоочищенного С1 ингибитора человека в 1 мл изотонического фосфатного буфера, pH 7,4, тщательно перемешивали с 1 мл полного адьюванта Фрейнда ("Difco Lab", США) и вводили внутримышечно кроликам в 10 точек спины. Имунную сыворотку контролировали на наличие антител к сывороточным белкам человека стандартным методом иммуноэлектрофореза. Моноспецифическую имунную сыворотку, содержащую только одну полосу преципитации с нормальной сывороткой человека, соответствующую С1 ингибитору, использовали для выделения фракции IgG хроматографией на DEAE-целлюлозе, а полученную фракцию антител для приготовления конъюгата с пероксидазой хрена стандартными методами.

Получение функционально активного субкомпонента C1s из сыворотки крови человека проводили методом, описанным ранее [7].

Определение количества С1 ингибитора. 100 мкл раствора антител к С1 ингибитору в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрации 20 мкг/мл вносили в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета и оставляли на ночь при 4°C. Планшет три раза отмывали вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca²⁺ и 0,5 мМ Mg²⁺ (VBS²⁺), по 200 мкл в каждую лунку. В каждую лунку вносили по 100 мкл 1,5% раствора бычьего сывороточного альбумина в том же буфере и инкубировали 1 ч при 37°C. Снова трижды отмывали планшет VBS²⁺. В лунки планшета каждого ряда вносили по 100 мкл раствора, содержащего определяемый С1-ингибитор в VBS²⁺, в виде прогрессивных двукратных разведений. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37° С, трехкратной отмывки фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против С1-ингибитора человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, пятикратной отмывки с детергентом и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного бу-фера (10 мг орто-фенилсндиамина в 25 мл цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 30 мин инкубации в

темноте реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 492 нм. Количество C1-ингибитора рассчитывали по стандартной кривой, полученной в результате проведения такого же эксперимента со стандартным раствором с известной концентрацией C1-ингибитора.

Определение функциональной активности C1 ингибитора. 100 мкл раствора активированного субкомпонента C1s в концентрации 1 мкг/мл или фармакопейного препарата фибринолизина с конечной активностью 1-10 ед/мл в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5 вносили в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета и оставляли на ночь при 4°C. Планшет три раза отмывали вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca²⁺ и 0,5 мМ Mg²⁺ (VBS²⁺), по 200 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета каждого ряда вносили по 100 мкл раствора, содержащего определяемый C1-ингибитор в VBS²⁺, в виде прогрессивных двукратных разведений. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37° С, трехкратной отмывки фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против C1-ингибитора человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С, пятикратной отмывки с детергентом и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного буфера (10 мг орто-фенилендиамина в 25 мл цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 30 мин инкубации в темноте реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 492 нм. Функциональную активность препарата C1-ингибитора рассчитывали по стандартной кривой, полученной в результате проведения такого же эксперимента со стандартным раствором с известной активностью C1-ингибитора.

Определение антител к C1 ингибитору. 100 мкл раствора кроличьих антител к C1 ингибитору в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрации 20 мкг/мл вносили в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета и оставляли на ночь при 4°C. Планшет три раза отмывали фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20 по 200 мкл в каждую лунку. В лунки планшета каждого ряда вносили по 100 мкл раствора, содержащего разведенные 1:20 сыворотки крови, в которых проводилось определение АТ к C1 ингибитору в фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, в виде прогрессивных двукратных разведений сыворотки. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37° С, трехкратной отмывки фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% твин-20, и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против IgG, IgA или IgM человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С, пятикратной отмывки с детергентом и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного буфера (10 мг орто-фенилендиамина в 25 мл цитратно-фосфатного буфера, pH 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 30 мин инкубации в темноте реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 492 нм. Количество аутоантител оценивали, сравнивая со значениями светопоглощения, полученных для стандарта - пула сывороток здоровых доноров крови. За нормальное содержание АТ принимали среднее значение, полученное для пула по крайней мере 10 сывороток доноров.

Определение активности компонентов комплемента в сыворотках крови больных проводили методом, описанным ранее [8].

C1 ИНГИБИТОР В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОТЕКОВ

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При диагностике отеков доля больных с действительными дефицитами C1 ингибитора составляет менее 50% [9]. Большинство отеков вызвано, как правило, аллергией. При этом наиболее характерным критерием является содержание компонента C4, которое бывает сниженным при наличии дефицитов C1 ингибитора.

Нами были обследованы 40 больных, страдающих отеками, у которых врачи заподозрили возможность дефицитов C1 ингибитора. Вместо определения количества компонента C4 мы определяли функциональную активность первых пяти компонентов комплемента. Оказалось, что функциональная активность компонентов комплемента C2, C3, C4, C5 была понижена, как правило, лишь у больных, имеющих тот или иной тип дефицита C1 ингибитора.

При исследовании дефицитов C1 ингибитора в клинике, как правило, пользуются нефелометрическим методом для определения количества этого белка в сыворотке крови и хромогенным методом определения его функциональной активности [9]. Наличие аутоантител к C1 ингибитору не определяют. Мы решили предложить единообразные иммуноферментные методы определения количества, активности C1 ингибитора и антител к нему.

Для определения количества C1 ингибитора был применен сэндвич-метод с посадочными кроличьими моноспецифическими поликлональными IgG антителами к C1 ингибитору и конъюгатом на основе тех же антител.

Из 40 сывороток количественный дефицит C1 ингибитора был обнаружен в 8 сыворотках. В одной из этих сывороток был обнаружен высокий уровень IgM антител к C1 ингибитору. Таким образом 7 сывороток следует отнести к НАО 1 типа.

Для определения функциональной активности C1 ингибитора мы воспользовались способностью этого ингибитора специфически ковалентно связываться с ингибируемым ферментом, как это делают ингибиторы сериновых протеиназ (серпины). Поэтому в ячейках сорбировали активированный субкомпонент C1s или коммерчески доступный препарат плазмина (фибринолизин). Для определения количества связавшегося при этом C1 ингибитора использовали тот же конъюгат, что и в первом методе.

В исследованных сыворотках кроме совпадения низкой активности с низким содержанием C1 ингибитора были обнаружены две сыворотки с нормальным и повышенным количеством C1 ингибитора как антигена. Эти две сыворотки были отнесены к НАО 2 типа

Для иммуноферментного обнаружения аутоантител к C1 ингибитору была сформирована иммуноферментная тест-система, в которой определяли иммунные комплексы C1 ингибитора с иммуноглобулинами всех классов. В качестве посадочных антител использовали АТ к C1 ингибитору (как и для определения количества этого белка), а для определения соответствующих иммунных комплексов применяли конъюгаты с пероксидазой соответствующих козьих антител против IgG, IgM или IgA человека.

Следует отметить, что ни в одном случае не было обнаружено IgA содержащих иммунных комплексов в количествах, превышающих их содержание в стандарте, сформированном из пула здоровых донорских сывороток. Повышенное содержание естественных анти-C1 ингибиторных IgG и IgM антител (примерно в 2 раза) наблюдалось главным образом в случаях, отнесенных в дальнейшем к аллергиям и, иногда, к НАО типа 1. Высокое 9-тикратное увеличение уровня IgM антител было обнаружено в одной из сывороток, в которой наблюдалось и снижение количества белка при сохранении активности. Можно предположить, что снижение определяемого количества C1 ингибитора было обусловлено наличием IgM антител, мешающих определению белка как антигена.

В таблице 1 приведены диагностические критерии, которыми мы пользовались для оценки природы отеков.

Таблица 1. Типы отеков и критерии их дифференциации.

Тип отека	Количество С1 ингибитора	Активность С1 ингибитора	Наличие АТ к С1 ингибитору	Функциональная активность компонентов комплемента
НАО 1 типа	снижено	снижена	отсутствуют	снижена
НАО 2 типа	норма	снижена	отсутствуют	снижена
Приобретенный отек	норма	норма	присутствуют в больших количествах	норма/снижена
Аллергический отек	норма/повышено	норма/повышено	могут присутствовать	норма/повышена

Проведенные исследования 40 сывороток крови больных с периодическими отеками позволили поставить диагноз, касающийся природы отеков. Для каждого типа отека один из критериев оказался решающим и характерным. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Типы отеков и главные критерии дифференциации для исследованных сывороток больных.

Тип отека	Главный критерий дифференциации	Число сывороток указанными критериями
НАО 1 типа	Снижение количества С1 ингибитора	7
НАО 2 типа	Снижение активности С1 ингибитора при сохранении его количества	2
Приобретенный отек	Высокое содержание АТ к С1 ингибитору	1
Аллергический отек	Высокий уровень активности комплемента и С1 ингибитора	30

Таким образом создан единообразный набор иммуноферментных методов для дифференциальной диагностики отеков. В данной работе были использованы гемолитические методы определения функциональной активности компонентов комплемента. Однако имеются разработанные авторами ранее также иммуноферментные методы определения количества и активности компонента С4, наиболее существенного при диагностике отеков [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Davis A.E. (1988) Ann. Rev. Immunol., **66**, 595-628.
2. Markovic S.N., Inwards D.J., Frigas E.A., Phylly R.P. (2000) Ann. Intern. Med., **132**, 144-150.
3. Circolo A., Strunk R.C. (1997) The Immunologist, **5**, 166-170.
4. Cicardi M.C., Agostoni A. (1996) N. Engl. J. Med., **334**, 1666-1667.
5. Gadek J.E., Hosea S.W., Gelfand J.A., Frank M.M. (1979) J. Clin. Invest., **64**, 280-285.
6. Nilsson T., Wiman B. (1982) Biochem. et biophys. acta, **705**, 271-276.
7. Козлов Л.В., Шойбонов Б.Б., Иванов А.Е., Зубов В.П., Антонов В.К. (1989) Биохимия, **54**, 1745-1751.
8. Козлов Л.В., Вавилова Л.М., Голосова Т.В. (1985) Иммунология, **3**, 66-68.
9. Gompels M.M., Lock R.J., Morgan J.E., Osborne J., Brown A., Virgo P.F. (2002) J. Clin. Pathol., **55**, 145-147.

10. Козлов Л.В., Лахтин В.М., Скороходова Т.Г., Баталова Т.Н., Шойбонов Б.Б., Дьяков В.Л., Гузова В.А., Матвеевская Н.С. (2000) Биорган. химия, **26**, 539-547.

Поступила 06.03.2002

DETERMINATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY AND CONCENTRATION OF C1 INHIBITOR AND AUTOANTIBODIES TO IT AS THE TOOL OF DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF ANGIOEDEMA

S.S. Anndina, L.V. Kozlov, V.L. D'yakov

Gabrichovsky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
Admiral Makarova, 10, Moscow, 125212 Russia; fax: (095)452-18-30,
e-mail: L.V.Kozlov@mtu-net.ru

Aetiology of angioedema (and therefore the scheme of its treatment) can be different. Angioedema may be subdivided into four categories: hereditary and acquired angioedemas, allergies and vasculitis. To establish the reason of the hereditary and acquired form of angioedema analyses of functional activity of complement components, quantities and activity of C1 inhibitor, presence (or absence) autoantibodies to C1 inhibitor allow. Sorption of the purified enzymes of activated subcomponent C1s or plasmin on microparticles allows to connect specifically in cells of plate C1 inhibitor from serum and with the help conjugate of antibodies against C1 inhibitor with a horse-radish peroxidase to determine quantity of connected functionally active C1 inhibitor. Addition of this test-system ELISA system for determination of quantitative contents of C1 inhibitor in serum, and also systems for definition IgG, IgA and IgM autoantibodies against C1 inhibitor finishes creation of a necessary set of methods of differential diagnostics.

Key words: complement system, C1 inhibitor, activity, deficiencies, autoantibodies, angioedema.