

УДК 612.124

© Коллектив авторов

### КАПЛЯ КОМПЛЕМЕНТА НОРОК УБИВАЕТ МЫШЬ

З.П. Белкин, Л.В. Козлов, С.С. Андина, А.А. Мишин, В.А. Гузова, В.Л. Дьяков.

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Минздрава РФ, 125212 Москва, ул. Адмирала Макарова, 10;  
тел.: (095)452-38-01; эл. почта L.V.Kozlov@mtu-net.ru

Феномен быстрой гибели мышей после парентерального введения сыворотки крови норки объяснен высокой активностью комплемента норки, в частности, необычно высокой активностью его альтернативного пути активации. Обнаружено присутствие в сыворотке норки антител к эритроцитам мыши, необходимых для их лизиса под действием комплемента норки по классическому и альтернативному путям. Однако удаление этих антител, приводящее к отмене гемолиза, не сказывается на токсичности сыворотки норки в отношении мыши в опытах *in vivo*. Частичная декомплементизация сыворотки норки с помощью зимозана полностью предотвращает гибель животных.

**Ключевые слова:** сыворотка крови норки, комплемент, антиэритроцитарные антитела, мышь, токсичность.

**ВВЕДЕНИЕ.** Ранее был описан феномен быстрой гибели мышей после парентерального введения сыворотки крови норки [1]. Поскольку было показано, что летальный фактор сыворотки термолабилен, имеет белковую природу, возникло предположение, что он представляет собой систему комплемента норки. Описана гибель животных при массивной активации комплемента, например, в результате так называемого шока Форссмана [2].

Настоящая работа посвящена проверке этой гипотезы.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали этиленгликоль-бис-( $\beta$ -аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусную кислоту (ЭГТА) фирмы "Sigma" (США). Остальные реактивы квалификации не ниже ч.д.а были отечественного производства. Кровь получали от 10 норок обоего пола массой 1-1,5 кг стандартной коричневой породы из зверосовхоза "Салтыковский". Кровь брали из сердца после забоя животных внутримышечной инъекцией дитилина.

Сыворотки норок, морских свинок и доноров крови, полученные со станции переливания крови, до исследования хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для определения функциональной активности компонентов комплемента норки использовали комплект реагентов для определения активности компонентов С1, С2, С3, С4 и С5 комплемента производства Кировского НИИ гематологии и переливания крови, а для определения активности С1q использовали реагент, получение которого описано ранее [3]. В работе использовали также эритроциты мышей С57BL/6, кролика, барана. Перед использованием эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором. Уровни гемагглютинирующих антител определяли в реакции пассивной гемагглютинации, гемолитическую активность сывороток микрометодом с эритроцитами мыши, кролика, барана или с эритроцитами барана, сенсibilизированных кроличьими антителами к эритроцитам барана

(ЕА), а гемолитическую активность отдельных компонентов комплемента с ЕА по методике, описанной в работах [4,5]. Альтернативный путь активации комплемента определяли методом, описанным в работе [6]. Определяемый титр в реакциях гемолиза численно соответствует номеру лунки половинного лизиса эритроцитов (Т) и соотносится с разбавлением сыворотки (в условиях двойных разведений) как  $1:2T^{-1}$ . Каждый опыт ставили 2-4 раза. При этом средой для изучения активации комплемента по классическому пути служил вероналовый буферный раствор, рН 7,4, содержащий 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca<sup>2+</sup> и 0,5 мМ Mg<sup>2+</sup> (VBS<sup>2+</sup>), а по альтернативному - тот же буфер, содержащий 10 мМ ЭГТА и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. В отдельных опытах использовали VBS, содержащий 10 мМ ЭДТА. Все буферы готовили, как описано в работах [4-6]. Адсорбцию сывороток норки эритроцитами проводили в присутствии 0,1 М ЭДТА в течение 30 мин при +4°C. Один объем сыворотки сорбировали половинным объемом осадка эритроцитов, центрифугировали и диализировали против VBS<sup>2+</sup>. В биологических опытах использовали мышей СВА или беспородных белых мышей массой 16-18 г. Сыворотку норки вводили под эфирным наркозом в ретроорбитальное венозное сплетение в дозе до 0,1 мл, объем вводимого материала доводили до 1 мл физиологическим раствором.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Как описано в работе Higgins и соавт. [2], гибель морских свинок при парентеральном введении им иммунной кроличьей антисыворотки против эритроцитов морских свинок обусловлено действием собственного комплемента, активирующегося на образующихся иммунных комплексах (в антисыворотке кроличий комплемент был инактивирован прогреванием). Естественные антитела к гетерологичным эритроцитам - явление не редкое. Поэтому наличие таких антител в сыворотке норки можно было ожидать. Кроме того, интересно было оценить гемолитическую способность сыворотки норки в результате действия классического и альтернативного путей активации. Определение функциональной активности компонентов классического пути активации комплемента норки, проведенное с помощью реагентов для определения активности компонентов комплемента человека и сенсibilизированных кроличьими антителами эритроцитов барана (ЕА), показало, во-первых, совместимость систем комплемента норки и человека и, во-вторых, очень высокую активность компонентов комплемента норки, близкую активности компонентов комплемента морской свинки (табл. 1). Активность основных компонентов классического пути комплемента норки превышала таковую для человека в 2-4 раза.

Таблица 1. Функциональная активность (Т) компонентов комплемента норки и человека.

Сыворотка	C1q	C2	C3	C4	C5
норки	7	7	8	8	7
морской свинки	7	8	8	7	8
человека	6	4	6	6	6

Исследование гемолитической активности комплемента с использованием различных эритроцитов позволяет оценить соотношение классического и альтернативного путей активации. Как известно, не всякие эритроциты являются активаторами альтернативного пути комплемента и не все животные обладают сравнительно мощным альтернативным путем активации комплемента. Так, например, эритроциты барана и человека не активируют альтернативный путь, а в сыворотке морских свинок альтернативный путь менее активен, чем в сыворотке человека. Поэтому была исследована гемолитическая активность сыворотки норки в обоих путях активации комплемента на различных эритроцитах, а также наличие в ней антиэритроцитарных антител.

### КОМПЛЕМЕНТ НОРКИ УБИВАЕТ МЫШЬ

Исследование способности сыворотки норки лизировать мышинные эритроциты показало, что все исследованные 20 сывороток проявили стандартную высокую активность в гемолизе ( $T = 6$ ). Способность сыворотки норки лизировать эритроциты мыши полностью устранялась в присутствии ЭДТА или при предварительном их прогревании при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин, что свидетельствует об участии в гемолизе комплемента норки. Для решения вопроса, по какому из путей активации (классическому или альтернативному) осуществляется гемолиз мышинных эритроцитов была исследована способность сыворотки норки лизировать эритроциты мыши в  $\text{VBS}^{2+}$  (классический путь активации) и в системе  $\text{Mg-ЭГТА-VBS}$  (альтернативный путь). В качестве препаратов сравнения использовали сыворотки человека (представлены оба пути активации) и морской свинки (преимущественно классический путь).

Комплемент норки проявляет равную высокую активность в лизисе эритроцитов мыши и кролика по классическому и альтернативному пути (табл.2). Эритроциты барана, не являясь активаторами альтернативного пути, не лизируются сывороткой норки в условиях альтернативного пути, но гемолиз в условиях активации классического пути сывороткой норки свидетельствует о наличии этого пути у комплемента норки. Лизис сывороткой норки не только сенсibilизированных эритроцитов барана (EA), но и интактных эритроцитов, свидетельствует в пользу наличия в сыворотке норки естественных антител против эритроцитов барана. Возможно, что та же причина обуславливает и лизис эритроцитов мыши и кролика в  $\text{VBS}^{2+}$ , хотя для гемолиза в этом случае достаточно уже наличия альтернативного пути. Следует обратить внимание на более высокую активность комплемента норки в альтернативном пути по сравнению с комплементами человека и морской свинки, проявляющуюся в лизисе интактных эритроцитов кролика - известных активаторов альтернативного пути [6]. Отсутствие лизиса эритроцитов мыши сыворотками человека и морской свинки и лизис их сывороткой норки в условиях альтернативного пути может свидетельствовать о необходимости для активации альтернативного пути покрытия эритроцитов мыши антителами и о том, что такие антитела имеются в сыворотке норки и отсутствуют в сыворотках человека и морской свинки, хотя антитела к эритроцитам мыши, способные запускать классический путь комплемента на эритроцитах мыши, в этих сыворотках имеются. Из этого следует, что антитела к эритроцитам мыши, необходимые для активации классического и альтернативного путей, разные. Из данных таблицы, 2 также следует, что в сыворотке морской свинки имеются антитела к эритроцитам мыши и кролика, активирующие классический путь комплемента, но нет аналогичных антител к эритроцитам барана.

Таблица 2. Сравнительная активность классического (в  $\text{VBS}^{2+}$ ) и альтернативного (в  $\text{Mg-ЭГТА-VBS}$ ) путей активации комплемента норки, человека и морской свинки при гемолизе разных видов эритроцитов.

Сыворотка	Эритроциты			
	мышь	кролика	барана	барана сенсibilизированные (EA)
Норки	6/6	5/5	6/0	7/0
Человека	2/0	2/2	4/0	5/0
Морской свинки	2/0	3/1	0/0	7/0

Примечание: Титр гемолиза (T): числитель - в  $\text{VBS}^{2+}$ , знаменатель - в  $\text{Mg-ЭГТА-VBS}$ .

Антитела к эритроцитам мышей в сыворотке норки обнаруживаются также реакцией агглютинации в титрах 3-5. Была исследована роль антиэритроцитарных антител в сыворотке норки в реакциях гемолиза по классическому и альтернативному путям. В качестве препарата сравнения использовали эритроциты барана. Результаты опытов с удалением антиэритроцитарных антител адсорбцией сыворотки норки приведены в таблице 3. После адсорбции эритроцитами лизис по обоим путям исчезал только для гомологичных эритроцитов. При этом другие эритроциты или уже сенсibilизированные эритроциты лизировались столь же успешно, как и неадсорбированной сывороткой норки. Эти опыты еще раз подтверждают специфичность антител и их необходимость (в случае эритроцитов мыши) для активации обоих путей комплемента.

Таблица 3. Активность классического (в VBS<sup>2+</sup>) и альтернативного (в Mg-ЭГТА-VBS) путей комплемента после адсорбции сыворотки норки эритроцитами.

Сыворотка норки, адсорбированная эритроцитами	Лизис эритроцитов		
	мышь	барана	барана сенсibilизированных (ЕА)
мышь	0/0	6/0	7/0
барана	6/6	0/0	7/0
без адсорбции	6/6	6/0	7/0

Примечание: Титр гемолиза (Т): числитель - в VBS<sup>2+</sup>, знаменатель - в Mg-ЭГТА-VBS.

Интересно отметить, что сыворотка норки, истощенная по антителам к эритроцитам мышей и, поэтому, не обладающая литическими свойствами в отношении этих эритроцитов, при введении в обычных летальных количествах (0,07 мкл) внутривенно убивает мышей (5 животных из 5, в трех сериях опытов). Из этого следует, что не запуск комплемента на эритроцитах является причиной гибели животных, а активация комплемента либо антителонезависимым путем, либо антителами, специфичными к другим (кроме эритроцитов) клеткам организма, и эти антитела сохраняются в сыворотке норки после адсорбции мышинными эритроцитами.

Таблица 4. Титры лизиса эритроцитов мышей и токсичность для мышей.

Сыворотка норки	Гемолитический титр		Токсичность	
	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 1	Опыт 2
после зимозана	3	4	0/5	0/5
без обработки	6	6	5/5	5/5

Примечание: (числитель - число погибших животных, знаменатель - общее число мышей) сыворотки норки после обработки зимозаном (в первом опыте сыворотку обрабатывали равным, а во втором - половинным объемом зимозана).

Дополнительным доказательством в пользу участия комплемента норки в токсическом действии ее сыворотки при внутривенном введении мышам является исследование токсичности сыворотки после снижения в этой сыворотке активности комплемента с помощью зимозана. Известно, что зимозан способен активировать систему комплемента по альтернативному пути. На примере сыворотки человека было показано, что активация альтернативного пути приводит к значительному потреблению факторов альтернативного и ряда компонентов

### КОМПЛЕМЕНТ НОРКИ УБИВАЕТ МЫШЬ

классического путей [5,7]. По данным таблицы 4, обработка сыворотки норки зимозаном приводит к снижению ее гемолитической активности (в 2-4 раза) и при этом сыворотка становится нетоксичной для мышей. Из этого следует, что гибель животных при внутривенном введении сыворотки норки обусловлена действием комплемента, уровень активности которого (по обоим путям активации) у норки чрезвычайно высок.

Работа поддержана грантом РФФИ 99-04-48793.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Белкин З.П. (1994). Бюл. эксперим. биол. и мед., №9, 290-291.
2. Higgins P.J., Ko J.-L., Lobell R., Sardonini C., Alessi M.K., Yeh C.G. (1997). *J. Immunol.* 158, 2872-2881.
3. Зинченко А.А., Сизой М.Н., Козлов Л.В. (1987). Способ получения реагента R1q. Авт. свид. СССР № 1362268 от 22.08.1987.
4. Козлов Л.В., Вавилова Л.М., Голосова Т.В. (1985). *Иммунология*, №3, 63-68.
5. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.И., Молчанова Н.Н. (1982). *Биоорганическая химия*, 8, 652-659.
6. Козлов Л.В., Соляков Л.С. (1982). *Биоорганическая химия*, 8, 342-348.
7. Козлов Л.В., Чих В.И., Соляков Л.С. (1982). *Биоорганическая химия*, 8, 817-821.

Поступила 10.1.02.

### A DROP OF MINK COMPLEMENT KILLS A MOUSE

Z.P. Belkin, L.V. Kozlov, S.S. Andina, A.A. Mishin, V.A. Guzova, V.L. D'yakov

Gabrichvsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Health Ministry of Russian Federation, 125212 Moscow, ul. Admirala Makarova, 10. Phone (095) 452-38-01; e-mail: L.V.Kozlov@mtu-net.ru

The phenomenon of fast death of mice after parenteral administration of mink serum was explained by high activity of mink complement in particular by unusually high activity of its alternative pathway of activation. The presence of antibodies to mouse erythrocytes in mink serum was necessary precondition for their lysis under action of mink complement by classical and alternative pathways. However, removal of these antibodies resulting in cancellation of hemolysis did not effect toxicity of mink serum for mice *in vivo*. Partial decompementization of mink serum zymosan completely prevented death of animals.

**Key words:** mink serum, complement, antibody to erythrocytes, mouse, toxicity