

УДК 577.15.08

©Коллектив авторов

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ

*С.В. Романов, Л.В. Козлов, В.Л. Дьяков, Т.Н. Баталова, В.А. Гузова*

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

Разработаны современные иммуноферментные методы определения функциональной активности компонента С2 и факторов В и D - протеиназ системы комплемента и компонента С3 - субстрата С3-конвертаз, ключевых комплексных ферментов комплемента. Существенной особенностью С3-конвертаз классического (C4bC2a) и альтернативного (C3bBb) путей активации комплемента является то, что их субстрат С3 после протеолитического расщепления превращается в активированный С3b, несущий на своей поверхности активную тиолсложноэфирную группу, осуществляющую ковалентную связь С3b с нуклеофильными акцепторами, что приводит к иммобилизации этого продукта протеолиза вблизи активирующего фермента.

Каскадный характер активации системы комплемента позволяет, искусственно создавая дефициты отдельных компонентов в экспериментальной системе и определяя иммуноферментным способом ковалентную иммобилизацию компонента С3, стоящего позже в процессе активации, определять функциональную активность любого из предшествующих компонентов, дефицит к которому создан. Использование такого приема привело к созданию иммуноферментных тест-систем для определения функциональной активности компонента С2 классического пути и факторов В и D альтернативного пути путем определения количества иммобилизовавшегося С3b при избытке С3.

Разработанные методы позволяют исследовать механизмы функционирования системы комплемента, ингибирование процессов каскада активации эндогенными и экзогенными ингибиторами, а также обнаруживать функциональный дефицит компонентов в сыворотке крови и других биологических жидкостях, что способствует диагностике заболеваний.

**Ключевые слова:** система комплемента, функциональная активность компонентов, иммуноферментные методы, С2, С3, С4, фактор В, фактор D.

**ВВЕДЕНИЕ.** Интерес к сложным протеолитическим системам живого организма всегда был движущей силой в изучении протеолиза. В отличие от большинства протеолитических процессов в организме система комплемента является сравнительно редким примером гетерогенного катализа, когда ферменты C1s, C1r, С3-конвертазы (классическая - C4bC2a или альтернативная - C3bBb), C5-конвертазы (соответственно - C4bC2aC3b и C3b<sub>n</sub>Bb) функционируют как иммобилизованные ферменты, когда иммобилизованы субстраты (C1s - субстрат C1r, фактор В в комплексе с C3b - субстрат фактора D) или иммобилизуется продукт реакции - C4b, C3b. Принцип определения функциональной активности иммобилизованного фермента, как известно, положен в основу иммуноферментного метода, в котором иммобилизация осуществляется в результате образования комплекса антиген-антитело. Расширение этого принципа, благодаря использованию

способности комплемента создавать комплексные иммобилизованные ферменты или иммобилизовать продукты реакции, позволило нам разработать новые иммуноферментные методы тестирования активности комплексных ферментов комплемента и, вместе с ними, функциональной активности отдельных компонентов комплемента. Это позволило изучать саму систему комплемента, исследуя, например, ингибирование ее на индивидуальных этапах каскада активации. Это позволило также создать клинически пригодные диагностические методы, поскольку функциональная активность компонентов комплемента является существенно более информативным критерием в деле диагностики по сравнению с их количественным содержанием как антигена (см. [1]).

Способность компонентов и факторов комплемента иммобилизоваться на иммуноферментных микропанелях в ходе каскада реакций активации комплемента была уже известна [2-4]. Нам оставалось, используя эту способность, разработать тест-системы для количественного определения функциональной активности компонентов комплемента не только в составе комплемента сыворотки крови, но и в индивидуальном виде. Только такие тест-системы могут быть использованы для определения активности как чистых компонентов комплемента, так и в составе других, помимо крови, биологических жидкостях (секреты, слезы и т.п.).

**МЕТОДИКА.** В работе были исследованы свежие сыворотки, предоставленные консультационно-диагностическим центром ГУ МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. В работе использованы: 96-луночные плоскодонные микропанели для иммуноферментного анализа отечественного производства (ГОСНИИМЕДПОЛИМЕР, г. Москва), твин-20, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин - ТМБ ("Sigma", США), адъювант Фрейнда ("Difco Lab.", США), пероксидаза хрена (НПО Биохимреактив, г. Олайне, Латвия), DEAE-сефацел ("Pharmacia", Швеция), этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота - EGTA ("Serva", Германия), остальные реактивы - отечественного производства не ниже ч.д.а. IgA (из сыворотки крови человека) и IgG3 (из сыворотки крови больного множественной миеломой) очищали хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-32 ("Whatman", Великобритания). Иммуноглобулиновый комплексный препарат для энтерального применения (КИП) производства ЗАО "Иммуно-Гем", (Россия).

*Получение компонентов C3 и C4 комплемента из сыворотки крови человека* осуществляли методом ионообменной хроматографии на DEAE-сефацеле, описанным в работе [5].

*Получение иммунохимически чистого компонента C3 из сыворотки морской свинки* проводили аналогично получению C3 человека методом, описанном в патенте [6].

*Получение кроличьих антител к компоненту C3 комплемента человека.* Иммунизацию кроликов осуществляли циклически с 10-дневным интервалом путем внутримышечных инъекций в 4 точки. Минимальное количество инъекций равнялось трем. Антигены (очищенный компонент C3) вводили животным в количестве 0,5-1 мг (в 1 мл физиологического раствора) на инъекцию. При первичной иммунизации растворы антигенов смешивали с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Последующие иммунизации проводили с использованием неполного адъюванта Фрейнда. Забор крови осуществляли из краевой ушной вены животного через 10 дней после последней иммунизации. Иммунную сыворотку контролировали на наличие антител к сывороточным белкам человека стандартным методом иммуноэлектрофореза [7]. Моноспецифическую иммунную сыворотку, содержащую две полосы преципитации с нормальной сывороткой человека, соответствующие C3 и C4 компонентам, истощали выделенным компонентом C4 от следов антител к этому компоненту. Таким образом, была получена иммунохимически чистая антисыворотка против C3, дававшая всего одну линию преципитации с нормальной сывороткой человека, соответствующую C3 компоненту. Из этой антисыворотки выделяли фракцию IgG хроматографией на DEAE-целлюлозе, а из

#### ИФА СИСТЕМЫ ПРОТЕИНАЗ КОМПЛЕМЕНТА

полученной фракции антител приготавливали конъюгат с пероксидазой хрена стандартными методами [8].

*Реагенты R2 и R3* получали как описано в работе [9].

*Реагенты RD и RB* получали как описано в работе [10].

*Определение гемолитической активности C2 и C3* проводили как описано в работе [9].

*Определение гемолитической активности факторов D и B* проводили как описано в работе [10].

*Определение активности C3 по классическому пути методом ИФА.* Полистироловые планшеты сенсibilизировали иммунохимически чистым IgG3 (30 мкг/мл) в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, внесением по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонной полистироловой 96-луночной микропанели и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. После трехкратной отмывки всех лунок планшета 4,55 мМ веронал-медианальным буфером, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, и последующего высушивания путем вытряхивания остатка жидкости, во все лунки вертикального ряда планшета добавляли по 100 мкл того же буфера. В первую лунку ряда вносили 100 мкл стандартной сыворотки в предварительном разведении 1:100 в том же буфере, перемешивали и раститровывали на восемь лунок ряда, последовательно перенося и перемешивая по 100 мкл раствора из каждой предыдущей лунки в каждую последующую. В остальные 88 лунок планшета вносили по 100 мкл образцов сывороток в разведении 1:800 в том же буфере. Затем во все 96 лунок планшета вносили по 10 мкл комплемента морской свинки в рабочем разведении, и с целью получения гомогенного раствора в каждой из лунок планшет встряхивали во время инкубации на электрокачалке. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной 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 C3 компонента человека в том же буфере в рабочем разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмывки тем же буфером и осушения микропанели в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора ТМБ в субстратном буфере. 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 450 нм. Функциональную активность препарата C3 рассчитывали по стандартной кривой.

*Определение активности C3 по классическому пути методом ИФА с добавлением солей никеля.* Иммунохимически чистый IgG3 растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрациях белка 10-100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета, который затем закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Планшет отмывали два раза вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca<sup>2+</sup> (VBS-Ca<sup>2+</sup>), внося по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета ряда вносили 75 мкл VBS-Ca<sup>2+</sup>, 15 мкл 0,1 М нитрата никеля (II) и 10 мкл сыворотки морской свинки. После инкубации в термостате в течение 30 мин при 37°C, двукратной отмывки VBS, содержащим 5 мМ ЭДТА, (VBS-E) и осушения планшета, в лунки планшета каждого ряда вносили по 100 мкл раствора, содержащего C3 в растворе VBS-E, в виде прогрессивных двукратных разведений. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной 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 компонента C3 человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной 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 СЗ рассчитывали по стандартной кривой.

*Определение активности С2 методом ИФА.* Иммунохимически чистый IgG растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрациях белка 10-100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета, который затем закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Планшет два раза отмывали вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 0,15 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  и 0,5 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  (VBS<sup>2</sup>), заливая по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем встряхивания остатка жидкости. В лунки планшета вносили по 100 мкл раствора VBS<sup>2</sup>, содержащего 10 мкл реагента R2 (R2 - сыворотка крови человека, прогретая при 50°C в течение 35 мин) и анализируемую пробу, содержащую компонент С2 с неизвестной активностью. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной 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 компонента СЗ человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной 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 С2 рассчитывали по стандартной кривой.

*Определение активности С3 по альтернативному пути методом ИФА.* Иммунохимически чистый IgA (или IgG, КИП - комплексный иммуноглобулиновый препарат, содержащий иммуноглобулины G, A и M, препарат компонента С3 морской свинки или другие активаторы альтернативного пути) растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрациях белка 10-100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета, который затем закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Планшет три раза отмывали вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 10 мМ EGTA и 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  (Mg-EGTA), заливая по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем встряхивания остатка жидкости. В лунки планшета ряда вносили по 100 мкл раствора Mg-EGTA, содержащего 10 мкл реагента R3 (R3 - сыворотка крови человека, обработанная полунасыщенным раствором KBr в течение 18 ч на холоду) и анализируемую пробу, содержащую компонент С3 с неизвестной активностью. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной 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 компонента С3 человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной 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 С3 рассчитывали по стандартной кривой.

*Определение активности фактора D методом ИФА.* Иммунохимически чистый IgA (или IgG, препарат компонента С3 морской свинки или другие

#### ИФА СИСТЕМЫ ПРОТЕИНАЗ КОМПЛЕМЕНТА

активаторы альтернативного пути) растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрациях белка 10-100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета, который затем закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Три раза отмывали планшет вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 10 mM EGTA и 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Mg-EGTA), заливая по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета ряда вносили по 100 мкл раствора Mg-EGTA, содержащего 10 мкл реагента RD (RD - сыворотка человека, лишенная фактора D с сохранением активностей остальных компонентов и факторов комплемента, получаемая, например, хроматографической сорбцией фактора D на колонке с CM-сефадексом С-50 из сыворотки крови человека) и анализируемую пробу, содержащую фактор D с неизвестной активностью. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37° С, двукратной 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 компонента С3 человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С, двукратной 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 фактора D рассчитывали по стандартной кривой.

*Определение активности фактора В методом ИФА.* Иммунохимически чистый IgA (или IgG, препарат компонента С3 морской свинки или другие активаторы альтернативного пути) растворяли в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9,5, в концентрациях белка 10-100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета, который затем закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Планшет три раза отмывали вероналовым буферным раствором, pH 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 10 mM EGTA и 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Mg-EGTA), заливая по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета ряда вносили по 100 мкл раствора Mg-EGTA, содержащего 10 мкл реагента RB (RB - сыворотка человека, лишенная фактора В с сохранением активностей остальных компонентов и факторов комплемента, получаемая, например, прогреванием ее в течение 30 мин при 50°C) и анализируемую пробу, содержащую фактор В с неизвестной активностью. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37° С, двукратной 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 компонента С3 человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С, двукратной 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 фактора В рассчитывали по стандартной кривой.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В каскадах первого этапа активации классического и альтернативного путей идет цепочка реакций, завершающихся образованием C5-конвертаз. Далее пути смыкаются с образованием общего для обоих путей мембраноатакующего комплекса (C5b-9). В классическом пути образование C5-конвертазы характеризуется активацией C3 и присоединением к

С3-конвертазе его активированного фрагмента С3b. В ходе этого пути предварительно активируются участвующие в образовании С3-конвертазы С4 и С2. Поэтому их активность определяет скорость образования С3b и может быть измерена при их дефиците и избытке других компонентов по количеству присоединившегося С3b. В альтернативном пути инициатором является каталитическое количество С3b или С3b-подобного (инактивированного С3), однако процесс массивной иммобилизации отдельных молекул С3b на активирующей поверхности (или на С3-конвертазе с превращением последней в С5-конвертазу) обусловлен функционированием альтернативной С3-конвертазы (С3bBb), образование которой определяется активностью фактора D (активирует фактор В) и фактора В (входит как фермент в состав С3-конвертазы). Поэтому количество образовавшегося С3b при соответствующем дефиците факторов определяется активностью дефицитного фактора.

Таким образом, ключевым во всех иммуноферментных тест-системах является С3 и определение его активации и ковалентной иммобилизации.

Вначале были созданы иммуноферментные тест-системы для определения функциональной активности компонента С3 при его активации в классическом и альтернативном путях. Для активации классического пути в лунках микропанели был сорбирован IgG3 (наиболее эффективный при активации классического пути). В качестве источника компонентов С1, С2 и С4 использовали сыворотку морской свинки, поскольку С3 морской свинки не обнаруживается кроличьими антителами против С3 человека. Для стабилизации образующейся в ходе активации С3-конвертазы иногда использовали ионы  $Ni^{2+}$  [11]. Активность компонента С3 определяли в различных образцах сывороток крови, взятых в различных разведениях. В этих сыворотках активность С3 была независимо определена разработанным ранее гемолитическим методом [9]. Количество ковалентно связавшегося в ходе инкубации С3b определяли иммуноферментным методом с помощью конъюгата кроличьих антител против С3 с пероксидазой хрена, используя хромогенный субстрат. Результаты показаны в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Определение активности компонента С3 (в мг/мл активного белка) в сыворотках крови гемолитическим (гемолиз) и иммуноферментным (ИФА) методами (в присутствии ионов никеля).

№ сыворотки	Гемолиз	ИФА
1	1,05	1,04
2	1,23	1,22
3	1,35	1,54
4	1,55	1,56
5	1,69	1,69

Таблица 2. Определение активности компонента С3 (в мкг активного белка в пробе) в образцах с известной активностью С3 методом ИФА (без никеля).

№ образца	Активность С3	ИФА
1	0,72	0,73
2	0,36	0,34
3	0,24	0,24
4	0,12	0,13

Если в описанной выше тест-системе заменить сыворотку морской свинки на реагент R2 - сыворотку крови человека, прогретую при 50°C в течение 35 мин для инактивации компонента С2, используемый в качестве источника компонентов С1, С4 и С3, то количество связавшегося в лунках микропанели С3b будет зависеть от функциональной активности компонента С2 в образце. Результаты показаны в таблицах 3 и 4.

Для определения функциональной активности компонента С3 при активации по альтернативному пути в лунках микропланшета сорбировали активаторы

### ИФА СИСТЕМЫ ПРОТЕИНАЗ КОМПЛЕМЕНТА

Таблица 3. Определение активности компонента C2 (в мкг/мл активного белка) в сыворотках крови гемолитическим и иммуноферментным методами.

№ сыворотки	Гемолиз	ИФА
1	21,2	20,0
2	20,0	21,2
3	24,0	22,8
4	24,0	25,0
5	31,4	26,2
6	41,6	34,2

Таблица 4. Определение активности компонента C2 (в мкг активного белка в пробе) в образцах с известной активностью C2 методом ИФА.

№ образца	Активность C2	ИФА
1	0,020	0,015
2	0,012	0,012
3	0,006	0,006
4	0,004	0,005
5	0,002	0,001

альтернативного пути - иммуноглобулины A, G, компонент C3 морской свинки (который не реагировал с кроличьими антителами против C3 человека), коммерческий препарат комплексного иммуноглобулина (КИП), содержащий IgA, IgG и IgM человека. После сорбции активатора вносили анализируемую пробу, содержащую активный компонент C3, инкубировали в присутствии  $Mg^{2+}$  и EGTA (для связывания ионов  $Ca^{2+}$  и предотвращения активации классического пути), а также реагента R3 (сыворотки человека, лишенной компонента C3 с сохранением активностей остальных компонентов комплемента, получаемой обработкой полунасыщенным раствором КВг в течение 18 ч на холоду [9]). В результате количество связавшегося C3b зависело от активности компонента C3. Завершали определение использованием того же конъюгата антител против C3 с ферментом, что и в предыдущих методах. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Определение активности компонента C3 по альтернативному пути иммуноферментным методом в образцах с известным содержанием активного белка (мкг).

№ образца	Активатор	Активность C3	ИФА
1	IgA	0,60	0,60
2	IgA	0,36	0,38
3	IgA	0,18	0,19
4	IgG	0,60	0,60
5	IgG	0,36	0,33
6	КИП	0,60	0,60
7	КИП	0,54	0,53
8	КИП	0,48	0,47
9	КИП	0,43	0,35
10	КИП	0,36	0,34
11	C3 морской свинки	0,60	0,60
12	C3 морской свинки	0,36	0,40
13	C3 морской свинки	0,12	0,16

Реализуя тот же подход, что и для определения функциональной активности компонента C2 с помощью конъюгата антител против C3, можно создать иммуноферментные тест-системы для определения активности фактора D альтернативного пути в присутствии реагента RD (сыворотки человека, лишенной

фактора D с сохранением активностей остальных компонентов и факторов комплемента, получаемой хроматографической сорбцией фактора D на колонке с CM-сефадексом C-50 [10]) или активности фактора В в присутствии реагента RB (сыворотки человека, лишенной активности фактора В с сохранением активностей остальных компонентов и факторов комплемента, получаемой прогреванием ее в течение 30 мин при 50°C), осуществляя все условия активации исключительно альтернативного пути (активаторы и связывание ионов кальция). Результаты испытания этих тест-систем, приведены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Определение активности фактора D иммуноферментным методом в образцах с известной концентраций активного белка (мкг/мл).

№ образца	Активатор	Активность D	ИФА
1	IgA	2,00	2,20
2	IgA	1,80	1,72
3	IgA	1,60	1,60
4	IgA	1,40	1,39
5	IgA	1,20	1,05
6	IgA	1,00	0,83
7	IgA	0,80	0,77
8	IgA	0,60	0,58
9	IgA	0,40	0,38
10	IgA	0,20	0,12
11	IgG	0,20	0,20
12	IgG	0,10	0,14
13	C3 морской свинки	0,10	0,10
14	C3 морской свинки	0,06	0,05
15	C3 морской свинки	0,02	0,04

Таблица 7. Определение активности фактора В иммуноферментным методом в образцах с известной концентраций активного белка (мкг/мл).

№ образца	Активатор	Активность В	ИФА
1	IgA	200	200
2	IgA	180	176
3	IgA	160	165
4	IgA	140	156
5	IgA	120	117
6	IgA	100	91
7	IgA	80	79
8	IgA	60	58
9	IgA	20	24
10	IgG	42	42
11	IgG	25	24
12	IgG	8	10
13	C3 морской свинки	11	11
14	C3 морской свинки	5	5
15	C3 морской свинки	3	3
16	C3 морской свинки	2	2

Испытания всех разработанных тест-систем показали их пригодность для определения активности компонентов C2, C3, факторов D и В в сыворотке крови. Чувствительность методов достаточна для обнаружения активных компонентов и факторов не только в крови, но и в других биологических жидкостях, что уже подтвердилось на предварительных этапах исследования содержания компонента C3 в слюне.

Некоторые модификации иммуноферментного метода определения функциональной активности компонента C3 позволяют исследовать способность



## ИФА СИСТЕМЫ ПРОТЕИНАЗ КОМПЛЕМЕНТА

нуклеофильных соединений - ингибиторов системы комплемента участвовать в блокировании образования C5-конвертазы путем "перехвата" C3b. Это было уже показано на примере действия лизоцима на систему комплемента [11].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов Л.В. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 634-641.
2. Zwirner J., Felber E., Reiter C., Riethmuller G., Feucht H.E. (1989) *J. Immunol. Methods*, **124**, 121-129.
3. Fredrikson G.N., Truedsson L., Sjoholm A.G. (1993) *J. Immunol. Methods*, **166**, 263-270.
4. Zwirner J., Dobos G., Gotze O. (1995) *J. Immunol. Methods*, **186**, 55-63.
5. 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) *Биоорганическая химия*, **26**, 817-824.
6. Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Мишин А.А., Гузова В.А., Баталова Т.Н., Лысакова С.В. (2000) Патент РФ 2149406. Бюллетень изобретений, № 14, 20.05.2000.
7. Ouchterlony O., Nilsson L.-A. (1978) *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwells Oxford, 1, pp. 19.1-19.44.
8. Wilson M.B., Norane P.K. (1978) *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, pp. 215-224.
9. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П., Молчанова Н.Н. (1982) *Биоорганическая химия*, **8**, 652-659.
10. Соляков Л.С., Козлов Л.В. (1983) *Биоорганическая химия*, **9**, 462-469.
11. Козлов Л.В., Лахтин В.М., Баталова Т.Н., Гузова В.А., Дьяков В.Л., Романов С.В. (2000) *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, **41**, № 6, приложение, 88-90.

Поступила 7.10.2002

## DETERMINATION OF ACTIVITY OF COMPLEMENT SYSTEM PROTEINASES BY IMMUNOENZYME METHODS

*S.V. Romanov, L.V. Kozlov, V.L. D'yakov, T.N. Batalova, V.A. Guzova*

Gabrichesky Moscow Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212 Moscow, Admirala Makarova street, 10; fax: (095)452-18-30; e-mail: LVKozlov@mtu-net.ru

Modern ELISA for determination of functional activity of component C2 and factors B and D, proteinases of a complement system, and component C3, substrate C3-convertases, key complex enzymes of the complement, have been developed. Essential feature of C3-convertases classical (C4bC2a) and alternative (C3bBb) pathways of the complement activation is that their substrate C3 after proteolytic cleavage is converted into C3b, carrying on the surface thioester covalent bond linking C3b with nucleophilic acceptors that results in immobilization of this proteolytic product near the activating enzyme.

Cascade character of an activation of complement system allows to create artificial deficit of separate components in the experimental system and to determine (by ELISA) covalently immobilized component C3 during activation, and also to determine functional activity of any of pre-exhausted components. Use of such approach resulted in the development of the ELISA systems suitable for determination of functional activity of component C2 of classical pathway and factors B and D of the alternative pathway by testing quantity of the immobilized C3b at excess C3.

The developed methods allow to investigate mechanisms of functioning of complement, inhibition of the cascade activation by endogenic and exogenous inhibitors, and also to find functional deficiency of components in serum and other biological fluids.

**Key words:** complement system, functional activity of components, ELISA, C2, C3, C4, factor B, factor D.