

НОВЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Черемных Е.Г.¹, Иванов П.А.¹, Фактор М.И.¹, Карпова Н.С.¹,
Васильева Е.Ф.¹, Гусев К.В.², Брусов О.С.¹

¹ ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

² ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. Система комплемента является важным компонентом врожденного иммунитета, обеспечивающим первичную защиту против проникающих в организм патогенов. Кроме того, показано, что система комплемента связана со многими заболеваниями, не только аутоиммунными и инфекционными, но и психическими. В связи с этим необходима разработка доступного и быстрого метода определения активности системы комплемента в режиме реального времени.

Представлен новый автоматизированный метод оценки функциональной активности системы комплемента (СК), основанный на цитолитическом действии этой системы для инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Метод состоит в циклическом подсчете живых подвижных клеток с помощью разработанного нами прибора БиоЛаТ, в состав которого входят две видеокамеры, устройства подсветки и перемещения круглого планшета, планшет с двумя рядами лунок, микропроцессорный блок управления. Управляет работой прибора и осуществляет подсчет клеток программа AutoCiliata. Подсчет производится на основе последовательной фиксации двух кадров с дальнейшей программной обработкой изображений.

Представлены результаты микроскопических наблюдений процесса гибели клетки в буфере на основе триэтаноламина с 5% концентрацией сыворотки крови, а также результаты сравнения активности СК в различных буферах — среде культивирования инфузорий, веронал-мединаловом буфере и буфере на основе триэтаноламина (ТЭА). Обоснована замена веронал-мединалового буфера на буфер на основе триэтаноламина.

Время гибели всех клеток в буфере на основе триэтаноламина с концентрацией сыворотки 5% не превышает 15 минут для всех исследованных сывороток. В качестве величин, характеризующих активность СК, выбраны время гибели половины клеток ($T_{\text{лд50}}$) и величина $100 \times (1/T_{\text{лд50}})\%$ (активность системы комплемента, АСК).

Представлены результаты оценки чувствительности метода, на основе зависимостей $T_{\text{лд50}}$ и АСК от концентрации сыворотки. Выдвинуто предположение о возможности оценки интегральной активности комплемента и соотношения интенсивностей синтеза и расхода его эффекторных белков.

Отражены результаты исследования разного содержания ионов Ca^{++} и Mg^{++} в буфере и обоснован выбор их физиологических концентраций, 2,5 мМ и 1,5 мМ соответственно.

Оценены статистические характеристики точности аппаратной и методической частей метода, средние коэффициенты вариации составляют 3,9 и 2,7% соответственно, что удовлетворяет требо-

Адрес для переписки:

Карпова Наталья Сергеевна
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 34.
Тел.: 8 (495) 952-91-41.
E-mail: nat_karpova@mail.ru

Address for correspondence:

Karpova Natalia S.
Research Center of Mental Health
115522, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye ch., 34.
Phone: 7 (495) 952-91-41.
E-mail: nat_karpova@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Черемных, П.А. Иванов, М.И. Фактор, Н.С. Карпова, Е.Ф. Васильева, К.В. Гусев, О.С. Брусов, «Новый метод оценки функциональной активности системы комплемента» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 479-488. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488

© Черемных Е.Г. и соавт., 2015

For citation:

E.G. Cheremnykh, P.A. Ivanov, M.I. Faktor, N.S. Karpova, E.F. Vasiljeva, K.V. Gusev, O.S. Brusov, "A new method to assess functional activity of serum complement system", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 479-488. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-479-488>

ваниям надежности результатов исследования, а короткое время исследования доказывает возможность применения метода в клинической практике в онлайн-режиме.

Разработан метод полуавтоматического определения функциональной активности сывороточного комплемента, который может быть использован в повседневной клинической практике, том числе в онлайн-режиме.

Ключевые слова: система комплемента, активность комплемента, *Tetrahymena pyriformis*, прибор БиоЛат, обработка изображения, подсчет клеток

A NEW METHOD TO ASSESS FUNCTIONAL ACTIVITY OF SERUM COMPLEMENT SYSTEM

Cheremnykh E.G.^a, Ivanov P.A.^a, Faktor M.I.^a, Karpova N.S.^a,
Vasiljeva E.F.^a, Gusev K.V.^b, Brusov O.S.^a

^a Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

^b N.A. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital № 1, Moscow Department of Health Care, Moscow, Russian Federation

Abstract. Complement system is an important component of innate immunity, providing primary protection against pathogens invading the body. In addition, it was shown that the complement system is associated with many diseases, not only autoimmune and infectious, but also mental disorders. In this regard, it is necessary to develop affordable and fast method of measuring activity of the complement system in real-time mode.

We present a new semi-automated method for assessment of serum complement activity. The assay is based on cytolytic action of complement system upon the ciliate organism *Tetrahymena pyriformis*. This method consists in repeated counting of live *Tetrahymena* motile cells by means of specially developed Biolat device, which consists of two video cameras, light sources, and movable round plate. The plate has two rows of holes. The device also includes microprocessor control unit based on AutoCiliata software, intended for control of operation module and counting the surviving cell. The calculations are based on fixation of two sequential video-frames, with subsequent software image processing.

Cell death events were observed upon incubation in triethanolamine (TEA) buffer containing 5% of blood serum. We have also compared complement activity in different buffers, i.e., standard medium for culturing of ciliates, Veronal-Medinalum buffer, and the TEA buffer. TEA buffer was found superior to the Veronal buffer when applied in the test system. The time of cell death in the TEA-buffered medium containing 5% serum was < 15 minutes for all the sera studied. The parameters denoting serum complement activity were as follows: a half-life time for the moving cells (T_{LD50}), and a similar value for 100% cell inactivation ($1/T_{LD50}$, functional activity of the complement system, ACS). The sensitivity of this assay was calculated from dependencies between T_{LD50} and ACS, and actual serum concentrations. We have suggested an opportunity for evaluation of an integral complement activity, and interrelations between the intensity of synthesis and consumption of its major effector proteins. In the course of this study, we have tested different concentrations of Ca^{++} and Mg^{++} ions in the incubation buffer, with optimal physiological concentrations of 2.5 mM and 1.5 mM, respectively. We have also estimated statistical precision characteristics for pre-analytical and analytical steps of the method. The average coefficients of variation (CV) were 3.9% and 2.7%, respectively, thus satisfying the reliability criteria in research. A short performance time of the study suggests its potential application in clinical practice, including online examination regimens.

A method for semi-automatic measurement of serum complement activity could be applicable in daily clinical practice, including the online performance.

Keywords: complement system, complement activity, *Tetrahymena pyriformis*, BioLat device, image processing, cell counts

Введение

Система комплемента (СК), самая древняя составляющая иммунитета, имеет важнейшее значение в защите организма человека и животных, но эта система часто бывает одним из зна-

чимых факторов неблагоприятного прогноза при многих заболеваниях, не только аутоиммунных или инфекционных. В настоящее время установлена связь системы комплемента и усиления патологического процесса при тяжелых травмах [5], болезнях сердца [11] и почек [12], рассеян-

ном склерозе [8], посттравматическом стрессе [3] психических заболеваниях, таких как депрессия [14], болезнь Альцгеймера [9], шизофрения [15], расстройства аутистического спектра [10] и др. Также установлено, что система комплемента является перспективной терапевтической мишенью [7], а умеренное и своевременное ее ингибирование облегчает течение болезни и улучшает прогноз [6]. Поскольку система комплемента выполняет жизненно важную функцию для организма, то терапевтическое воздействие на эту систему должно обязательно контролироваться в режиме реального времени.

Сегодня активность комплемента в целом, отдельных путей или отдельных компонентов оценивают по степени гемолиза эритроцитов барана [2] и с помощью иммуноферментного метода [4]. Эти методы не позволяют оценивать уровень активности СК в режиме реального времени, а себестоимость иммуноферментных диагностических систем делает их недоступными для широкого применения сегодня. Кроме того, гемолитический метод часто дает ложноположительные результаты из-за реактивного лизиса [1], что снижает его достоверность.

Поэтому разработка быстрого, технологичного и дешевого метода интегральной оценки функциональной активности комплемента, не дающего реактивного лизиса, актуальна и, возможно, будет востребована медицинской практикой.

Материалы и методы

Объектом исследования является сыворотка венозной крови здоровых доноров. Сыворотку получали из крови сразу после отбора, замораживали при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и использовали для исследования в течение 7 дней.

Разрабатываемый метод оценки активности системы комплемента основан на действии СК на простейших *Tetrahymena pyriformis* и регулярном циклическом подсчете их количества в пробах с сывороткой до полной гибели простейших.

Штамм инфузорий WH14 был любезно предоставлен профессором Долговым В.А. (Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии гигиены и экологии). Культивировали инфузории при стабильной температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ на стерильной 4-компонентной среде: 0,5% пептон, 0,5% глюкоза, 0,1% дрожжевой экстракт, 0,1% хлористый натрий (все реактивы фирмы Sigma). На четвертые сутки после

пересева на свежую среду инфузорий использовали в опытах.

Для микроскопических наблюдений использовался микроскоп Imager M1 Carl Zeiss с объективами 10x и 40x, оборудованный камерой AxioCam HRc.

Регулярный подсчет живых подвижных клеток простейших осуществляли с помощью разработанных нами прибора БиоЛаТ-3 (рис. 1) и управляющей программы AutoCiliata (рис. 2). Прибор выполнен в цилиндрическом корпусе, в его состав входят следующие узлы:

- 2 видеокамеры с объективами;
- 2 устройства подсветки;
- устройство перемещения круглого планшета;
- планшет с двумя рядами лунок;
- микропроцессорный блок управления камерами и перемещением планшета.

В опыте лунки последовательно позиционируются под объективы видеокамер для подсчета в них живых клеток. Подсчет в каждой лунке производится на основе последовательной фиксации двух кадров каждой лунки и дальнейшей программной обработки изображений результатов вычитания, отражающих информацию только о подвижных объектах. Обработка состоит в выявлении и подсчете всех объектов заданной площади. Подсчет осуществляется до полной гибели инфузорий во всех заданных лунках. Далее программа рассчитывает время гибели половины от начального количества клеток ($T_{\text{лд}50}$) и величину активности системы комплемента – $\text{АСК} = 100 \times (1/T_{\text{лд}50})\%$. В режиме реального времени результаты подсчета каждой лунки отражаются на экране в виде графика изменения количества клеток (рис. 2). Процесс, отражаемый



Рисунок 1. Прибор БиоЛаТ-3

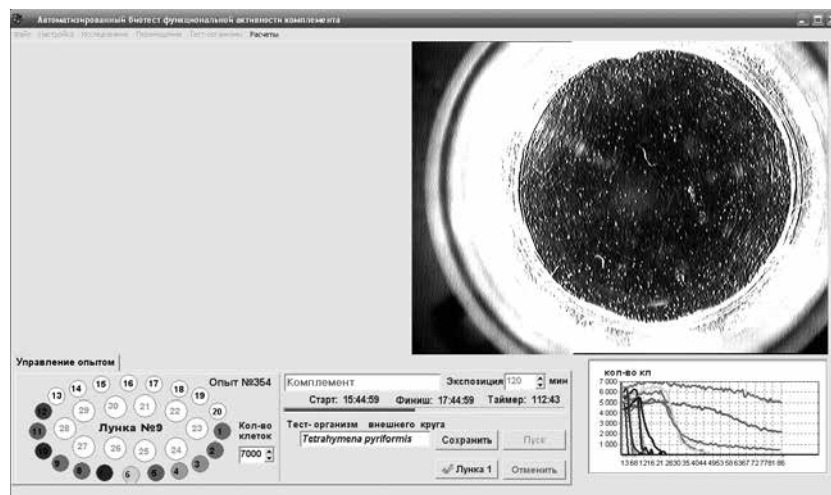


Рисунок 2. Основной интерфейс программы AutoCiliata, предназначенной для подсчета живых подвижных объектов

графиком, имеет 3 фазы: лаг-фаза — количество клеток почти не меняется, фаза быстрой гибели клеток и фаза стабильного остаточного количества клеток. Через 2 часа результаты и рассчитанные параметры комплемента сохраняются в файле Excel. Если во всех лунках произошла полная гибель клеток раньше чем за 2 часа, то все можно сохранить, при включении соответствующей команды.

Исследования проводили при стабильной температуре 25 °С в трех разных буферах:

1. Среда культивирования инфузорий.

2. Веронал-мединаловый буфер (ВБС⁺⁺) с рН 7,5: 0,78 мМ веронала, 0,73 мМ мединала, 0,73 мМ NaCl 2,5 мМ Mg⁺⁺, 0,75 мМ Ca⁺⁺ (MgCl₂, CaCl₂); обычно используется для оценки активности комплемента по гемолизу эритроцитов.

3. Буфер на основе триэтаноламина (ТЭА⁺⁺) с рН 7,5: 1 мМ ТЭА и несколько вариантов концентраций (0-10 мМ) Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺.

Все реактивы фирмы Sigma.

Результаты

1. Визуальное наблюдение гибели *Tetrahymena pyriformis*

При наблюдении за состоянием клеток *Tetrahymena pyriformis* с помощью оптического микроскопа установлена их гибель через 5-7 минут после добавления сыворотки в концентрации 5%, и уже через 15 минут живых клеток не остается. Процесс гибели индивидуальной клетки занимает около одной минуты и сопровождается выраженными изменениями морфологии клетки. На рисунке 3 представлены изображения

индивидуальной клетки в процессе гибели, полученные с интервалом в 20 секунд.

Время гибели всех клеток в буфере на основе триэтаноламина с концентрацией сыворотки 5% не превышает 15 минут для всех исследованных сывороток. В качестве величин, характеризующих активность СК, выбраны время гибели половины клеток (Т_{лд50}) и величина, равная 100 (1/Т_{лд50})% (активность системы комплемента, АСК).

2. Сравнение действия сыворотки крови здоровых доноров на инфузории *Tetrahymena pyriformis* в трех разных буферах: среда культивирования инфузорий, ВБС⁺⁺, ТЭА⁺⁺

2.1. Сравнение действия сыворотки в среде культивирования и буфере ТЭА⁺⁺

Общий объем в каждой лунке — 300 мкл. Для получения разных концентраций сыворотки в среде культивирования в лунки 1-3 планшета прибора БиоЛаТ ввели по 270 мкл среды культивирования и по 15 мкл сыворотки (концентрация сыворотки 5%), 4-6 — 255 мкл среды и 30 мкл сыворотки (концентрация сыворотки 10%), 7-9 — 225 мкл среды и 60 мкл сыворотки (концентрация сыворотки 20%). В лунки 10-12 ввели 270 мкл буфера ТЭА⁺⁺ и 15 мкл сыворотки.

После включения прибора ввели в каждую лунку по 15 мкл среды с инфузориями и запустили процесс циклического подсчета клеток в 12 лунках с помощью команды «Комплемент» программы AutoCiliata.

При разведении сыворотки средой в 5 раз АСК = 21,98 и Т_{лд50} = 4,55, в 10 раз — АСК = 10,6 Т_{лд50} = 9,43, в 20 раз — АСК = 3,39 Т_{лд50} = 29,49, в буфере ТЭА⁺⁺ с 2,5 мМ Ca⁺², 1,5 мМ Mg⁺², при

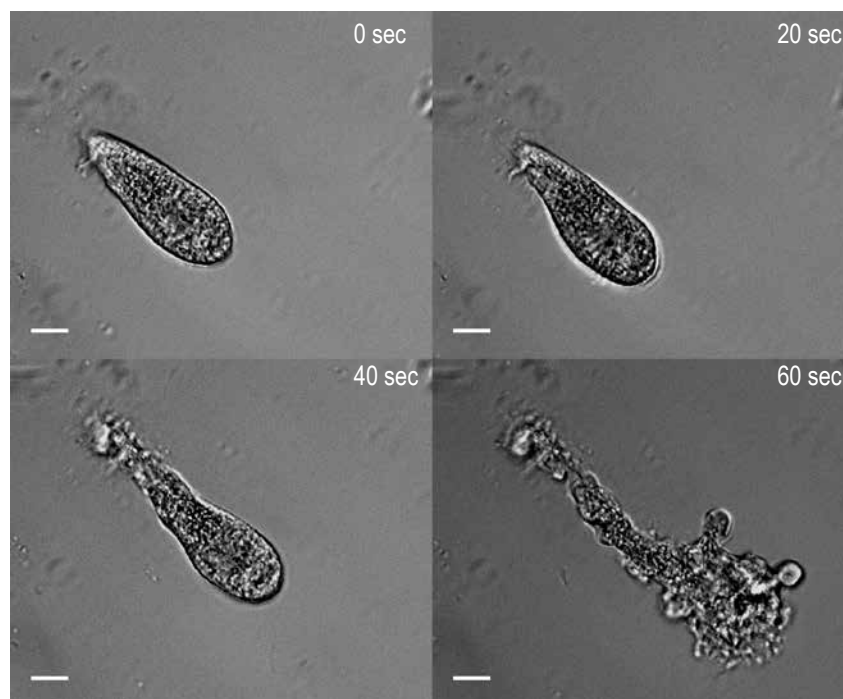


Рисунок 3. Гибель клетки *Tetrahymena pyriformis* при активации СК

20-кратном разведении сыворотки АСК = 21,32
 $T_{LD50} = 4,69$.

Таким образом, в буфере ТЭА⁺⁺ с физиологическими концентрациями ионов кальция и магния активность комплемента в 4 раза выше, чем в среде культивирования.

2.2. Сравнение действия сыворотки в буферах ВБС⁺⁺ и ТЭА⁺⁺

Буфер в системе «сыворотка крови – инфузории» нужен, во-первых, для обеспечения постоянной величины рН = 7,5, во-вторых, для обеспечения необходимых для активации СК концентраций ионов Ca⁺² и Mg⁺². В состав веронал-мединалового буфера входят наркотологические препараты, следовательно, сейчас они стали недоступны, поэтому было решено использовать буфер на основе триэтаноламина с физиологическими концентрациями ионов кальция и магния.

Этот буфер (1 мМ ТЭА, 2,5 мМ Ca⁺², 1,5 мМ Mg⁺², рН 7,5) оценили на токсичность. Выживаемость простейших через 24 часа составляет 100%. Это означает, что в выбранных концентрациях триэтаноламина и солей буфер нетоксичен для инфузорий *Tetrahymena pyriformis*.

Для сравнения активности СК в 2-х буферах использовали 12 сывороток крови здоровых доноров. В каждую из 12 лунок планшета ввели 270 мкл буфера, 15 мкл одной из 12 сывороток и 15 мкл среды с инфузориями. Опыт повторен дважды с двумя разными буферами.

Результаты сравнения активности СК для 12 сывороток в буферах ВБС⁺⁺ и ТЭА⁺⁺ представлены в таблице 1. Коэффициент корреляции по 12 сывороткам для АСК в 2-х буферах составляет 0,8506.

2.3. Активность системы комплемента при разных концентрациях ионов Ca⁺² и Mg⁺²

Концентрации ионов Ca⁺² и Mg⁺², а также Na⁺ в веронал-мединаловом буфере, применяемом в методе оценки активности комплемента по гемолизу эритроцитов, вероятно, определены в соответствии с особенностями тест-объектов (эритроцитов), в литературных данных обоснования солевого состава ВБС⁺⁺ не найдено. Поскольку в разрабатываемом методе используется другой тест-объект, то концентрации солей необходимо выбирать, руководствуясь только особенностями системы комплемента, т.к. инфузории нормально функционируют в широком диапазоне концентраций солей, и оптимальный рН для этих простейших около 7.

Физиологическими значениями в крови концентраций Ca⁺² и Mg⁺² являются 2,5 мМ и 1,5 мМ соответственно. Поэтому для исследования влияния этих ионов на активность комплемента был выбран диапазон концентраций от 0 до 10 мМ. Изменение активности системы комплемента в зависимости от концентраций Ca⁺² и Mg⁺² представлено на графиках рисунков 4, 5.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СК В ДВУХ БУФЕРАХ ВБС⁺⁺ И ТЭА⁺⁺

№ сыворотки	Тлд50 (ВБС ⁺⁺), мин	АКС (ВБС ⁺⁺)	Тлд50 (ТЭА ⁺⁺), мин	АКС(ТЭА ⁺⁺)
1	6,4	15,625	6,45	15,50387597
2	6,9	14,49275362	6,9	14,49275362
3	9,3	10,75268817	9,5	10,52631579
4	6,9	14,49275362	6,9	14,49275362
5	6,9	14,49275362	6,9	14,49275362
6	7,3	13,69863014	8,1	12,34567901
7	6,3	15,87301587	8,1	12,34567901
8	6,5	15,38461538	6,9	14,49275362
9	8,7	11,49425287	8,9	11,23595506
10	8,5	11,76470588	8,9	11,23595506
11	9,4	10,63829787	9,4	10,63829787
12	7,15	13,98601399	7,6	13,15789474
	коэф. корреляции	0,850621357		

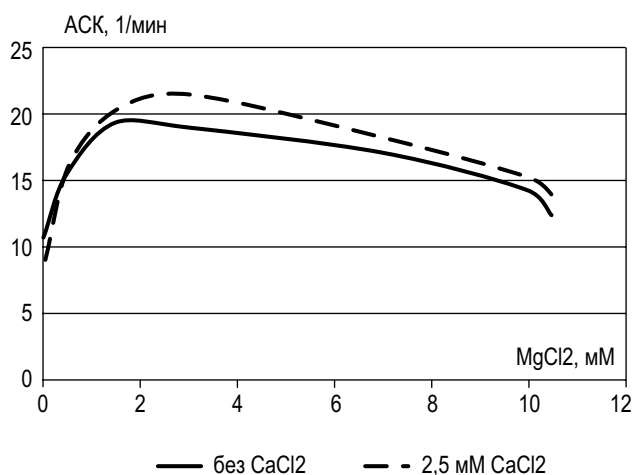


Рисунок 4. Изменение активности комплемента в зависимости от концентрации Mg²⁺ в буфере

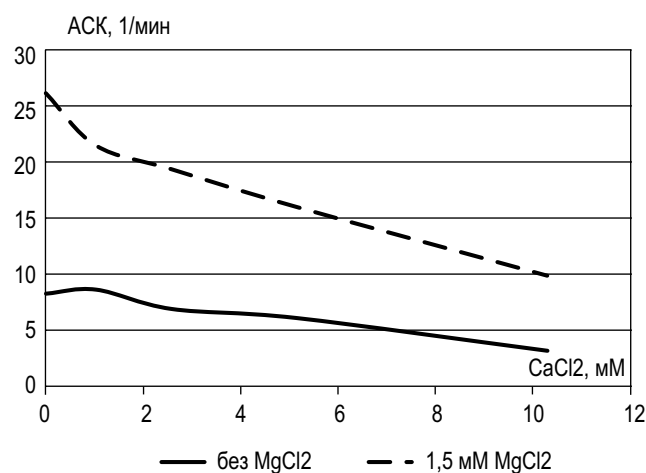


Рисунок 5. Изменение активности комплемента в зависимости от концентрации Ca²⁺ в буфере



Рисунок 6. Зависимость изменений параметров (1 – Тлд₅₀, 2 – АСК) активности СК от концентрации сыворотки

3. Чувствительность метода

Чувствительность метода определяли с помощью изучения $T_{\text{лд50}}$ и АСК для разных концентраций сыворотки – 5, 2,5, 1,25 и 0,625%. Этот диапазон концентраций сыворотки выбран исходя из результатов многократных различных сывороток здоровых людей. При концентрации сыворотки выше 5% гибель простейших может происходить слишком быстро (< 1 минуты) и точность метода снижается, а при концентрации ниже 0,5% часто невозможно определить АСК, т.к. гибели инфузорий не происходит.

Результат оценки $T_{\text{лд50}}$ и АСК для концентраций сыворотки – 5, 2,5, 1,25 и 0,625% – представлен на графиках рисунка 6.

4. Статистические характеристики метода

Оценку точности подсчета живых клеток на приборе БиоЛаТ проводили с помощью режима программы AutoCiliata «Экспресс-тест», который заключается в многократном подсчете клеток в заданных лунках. Подсчет производили в 10 лунках 10 раз. Результат подсчета представлен в таблице 2. Коэффициент вариации по всем лункам не превышает 5%, а средний коэффициент вариации равен 3,9%

Результат оценки одной и той же сыворотки в разное время представлен на графиках рисунка 7.

Обсуждение

Цитолитическое действие сыворотки крови для инфузорий замечено давно, а предположение о том, что гибель простейших происходит в результате активации системы комплемента, было

высказано уже в 1958 году [13]. Проблема использования этих тест-объектов для оценки комплемента состояла в вариабельности чувствительности культур и невозможности количественной оценки результата. При культивировании инфузорий в описанных условиях и использовании их в опыте всегда в одной фазе роста культуры (на 4 сутки) задача стабилизации чувствительности решена, что доказано в испытаниях одной и той же сыворотки в периоде 2-х недель. Точность подсчета живых подвижных клеток с помощью прибора БиоЛаТ показана в таблице 2. Коэффициенты вариации не превышают 5%. Таким образом, инструментальная составляющая разрабатываемого метода удовлетворяет требованиям по надежности и достоверности результатов.

При микроскопическом наблюдении за состоянием клетки *Tetrahymena pyriformis* в буфере ТЭА⁺⁺ с концентрацией сыворотки 5% был зафиксирован процесс ее гибели, представленный на рисунке 3 последовательностью кадров. Целостность клетки нарушается из-за сквозных отверстий в районе клеточного рта, где клеточная мембрана наиболее тонка, и мембрано-атакующие комплексы, образующиеся в результате активации СК, быстро меняют осмотическое давление клетки. При этом содержимое клетки вытекает наружу. Это наблюдение, а также ряд исследований, касающихся действия на СК известных ингибиторов сериновых протеаз и не вошедших в настоящую статью, доказывают утверждение о том, что гибель простейших происходит в результате активации комплемента сыворотки крови.

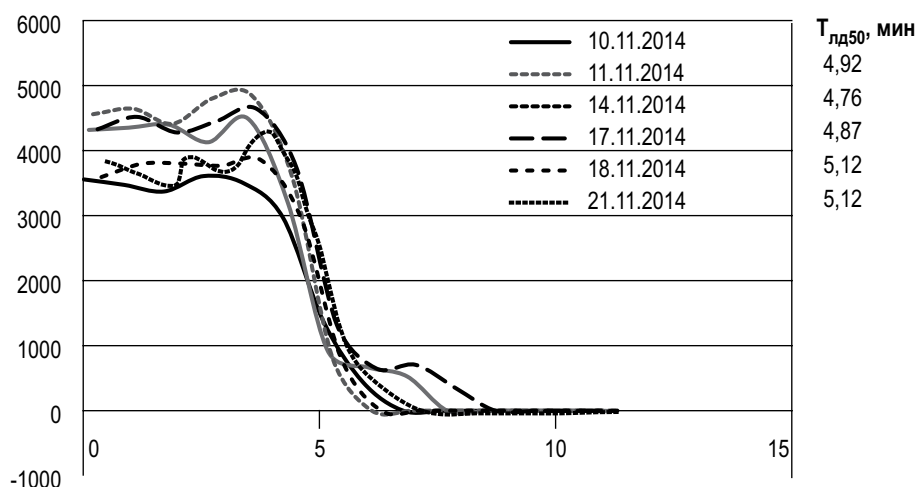


Рисунок 7. Оценка активности СК сыворотки в разное время. Средний коэффициент вариации для $T_{\text{лд50}}$ равен 2,7%.

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА ТОЧНОСТИ ПОДСЧЕТА ЖИВЫХ ПОДВИЖНЫХ ОБЪЕКТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРА БиоЛат

№ лун./ № подсчета	1	2	4	5	6	7	8	9	10
1	5401	5992	4925	5041	5667	5866	4894	5971	5274
2	5514	6124	4985	5279	5942	6095	5146	6127	5214
3	5314	6156	5251	5406	5899	6174	4899	6148	4871
4	5108	5415	4766	4967	5797	5936	4836	6343	5117
5	5075	5542	4817	5250	5742	6055	4835	6041	4763
6	4938	5804	4802	5137	5400	6083	4810	6035	4954
7	5060	5716	4594	4937	5463	5698	4660	5900	4866
8	4910	5715	4611	4809	5533	5679	4643	5993	4896
9	4847	5572	4690	4797	5329	5588	4779	5837	4617
10	5075	5454	4640	4782	5406	5759	4770	5651	4862
среднее	5124,2	5749	4808,1	5040,5	5617,8	5893,3	4827,2	6004,6	4943,4
ср. кв. отклонение	218,89	267,36	202,73	220,98	221,36	205,34	141,09	187,86	203,29
коэф. вариации	4,27	4,65	4,22	4,38	3,94	3,48	2,92	3,13	4,11

Изменение активности СК в зависимости от концентраций ионов магния и кальция (рис. 4, 5) отражает особенности механизма СК. Для ионов магния существует максимум при 3 мМ в условиях содержания кальция (0,125 мМ содержится при разведении сыворотки в 20 раз) и при 1,5 мМ в условии 2,5 мМ (в буфере) + 0,125 мМ (в сыворотке). При концентрациях магния от минимальной (0,075 мМ) до 1,5 или 3 мМ активность СК резко возрастает, что говорит о возрастании доли в активности СК петли амплификации в альтернативном пути, имеющего магний-зависимые ферменты. Активность СК при содержании магния от 1,5 или 3 мМ до 10 мМ медленно убывает, а при концентрации выше 10 мМ резко падает. Вероятно, высокие концентрации магния ингибируют СК, замещая ионы кальция в кальций-зависимых ферментах классического и лектинового путей.

Характер зависимости АСК от концентрации ионов кальция иной. График монотонно увеличивается при увеличении концентрации кальция, при этом АСК в буфере с 1,5 мМ ионов магния существенно выше, чем в буфере без магния. Монотонное увеличение АСК можно объяснить наличием в СК кальций-зависимых эффекторов и ингибиторов, на роль последнего может претендовать фактор I, являющийся сериновой про-

теазой. Почти линейная зависимость объясняется тем, что функции активации и ингибирования в СК сбалансированы на одинаковом уровне общей активности эффекторов и ингибиторов. Увеличенный уровень АСК (пунктирная линия) при концентрации ионов магния 1,5 мМ свидетельствует о высоком вкладе магний-зависимой петли амплификации.

Зависимость $T_{лд50}$ от концентрации сыворотки является псевдогиперболической (рис. 6), т.к. хорошо аппроксимируется гиперболой в выбранном диапазоне концентраций, но при концентрации меньше 0,5% для большинства исследованных сывороток не происходит гибели инфузорий, т.е. в верхней части кривая имеет обрыв. В нижней части кривой (при увеличении концентрации выше 5%) значение $T_{лд50}$ очень быстро приближается к 0, и поэтому время $T_{лд50}$ невозможно оценить.

Зависимость величины АСК от концентрации исследованной сыворотки аппроксимирована квадратным уравнением ($АСК = -0,2755X^2 + 4,7935X - 1,6595$). Вычисленное значение концентрации сыворотки, при которой гибели инфузорий не происходит ($АСК = 0$), равно 0,35%. Для всех исследованных сывороток эта концентрация меньше 1,25% и является особенностью СК конкретного человека и/или особенностью

патологии. АСК₀ характеризует интенсивность синтеза эффекторов СК, т.е. количество активных ферментов, в результате действия которых формируется мембрано-атакующий комплекс (МАК).

Для концентраций сыворотки 5% и выше величина T_{лд50} отражает и собственно суммарную активность ферментной каскадной системы комплемента и количество активных молекул. Соотношение T_{лд50}(5%)/T_{лд50}(0,625%) может характеризовать степень истощения СК: чем больше эта величина, тем меньше эффекторных молекул СК в сыворотке и, соответственно, образуется меньше МАК. Таким образом, эта величина может

служить оценкой соотношения синтеза и расхода эффекторных молекул СК.

Статистические параметры (табл. 2, рис. 7) как аппаратной части, так и метода оценки активности СК удовлетворяют требованиям надежности результатов исследования, а короткое время исследования доказывает возможность применения метода в клинической практике в онлайн-режиме.

В заключение можно сказать, что вышеописанный метод по чувствительности, воспроизводимости, степени автоматизации его проведения и расчета может служить основой для использования его в широкой медицинской практике после его полной валидации и сертификации.

Список литературы / References

1. Кулешина О.Н., Андина С.С., Попова О.П., Черемных Е.Г., Козлов Л.В. Активность комплемента при коклюше // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2013. Т. 2, № 69. С. 46-51. [Kuleshina O.N., Andina S.S., Popova O.P., Cheremnykh E.G., Kozlov, L.V. Activity of complement in pertussis]. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccination*, 2013, Vol. 2, no. 69, pp. 46-51. (In Russ.)]
2. Кулешина О.Н., Козлов Л.В., Черемных Е.Г. Универсальный метод определения функциональной активности комплемента человека, лабораторных, домашних и сельскохозяйственных животных, земноводных и птиц // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 2. С. 254-257. [Kuleshina O.N., Kozlov L.V., Cheremnykh E.G. Universal method for determining the functional activity of the human complement, laboratory, domestic and farm animals, amphibians and birds]. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 2, pp. 254-257. (In Russ.)]
3. Оганесян Л.П., Мкртчян Г.М., Сукиасян С.Г., Амбарцумян М.К., Аветисян Г.В., Бояджян А.С. Комплемент как патогенный фактор при посттравматическом стрессе // Биологический журнал Армении, 2009. Т. 1, № 61. С. 48-53. [Oganesyanyan L.P., Mkrtychyan G.M., Sukiasyan S.G., Ambardzumyan M.K., Avetisyan G.V., Boyajyan A.S. Complement as a pathogenic factor in post-traumatic stress]. *Biologicheskiy zhurnal Armenii = Biologist. Journal Armenia*, 2009, Vol. 1, no. 61, pp. 48-53. (In Russ.)]
4. Романов С.В., Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Баталова Т.Н., Гузова В.А. Определение активности протеиназ системы комплемента иммуноферментными методами // Биомедицинская химия, 2003. Т. 49, № 6. С. 604-612. [Romanov S.C., Kozlov L.V., Dyakov V.L., Batalova T.N., Guzova V.A. Determination of the activity of proteases of the complement system immunoassay methods]. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2003, Vol. 49, no. 6, pp. 604-612. (In Russ.)]
5. Bellander B.M., Singhrao S.K., Ohlsson M., Mattsson P., Svensson M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J. Neurotrauma*. 2001, Vol. 18, no. 12, pp. 1295-1311.
6. Ducruet A.F., Zacharia B.E., Sosunov S.A., Gigante P.R., Yeh M.L., Gorski J.W., Otten M.L., Hwang R.Y., DeRosa P.A., Hickman Z.L., Sergot P., Connolly E.S.Jr. Complement Inhibition Promotes Endogenous Neurogenesis and Sustained Anti-Inflammatory Neuroprotection following Reperfused Stroke. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 6, p. e38664.
7. Hillmen P. The role of complement inhibition in PNH. *American Society of Hematology*, 2008, Vol. 1, pp. 116-123.
8. Ingram G., Loveless S., Howell O.W., Hakobyan S., Dancey B., Harris C.L., Robertson N.P., Neal J.W., Morgan B.P. Complement activation in multiple sclerosis plaques: an immunohistochemical analysis. *Acta Neuropathol. Commun.*, 2014, Vol. 9, no. 2, p. 53.
9. Loeffler D.A., Camp D.M., Bennett D.A. Plaque complement activation and cognitive loss in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 2008, Vol. 11, no. 5, p. 9.
10. Momeni N., Bergquist J., Brudin L., Behnia F., Sivberg B., Joghataei M.T., Persson B.L. A novel blood-based biomarker for detection of autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry*, 2012, Vol. 13, no. 2, p. e91.
11. Palikhe A., Sinisalo J., Seppänen M., Haario H., Meri S., Valtonen V., Nieminen M.S., Lokki M.L. Serum complement c3/c4 ratio, a novel marker for recurrent cardiovascular events. *Am. J. Cardiol.*, 2007, Vol. 1, no. 99 (7), pp. 890-895.

12. Roos A., Bouwman L.H., van Gijlswijk-Janssen D.J., Faber-Krol M.C., Stahl G.L., Daha M.R., Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 1, no. 167 (5), pp. 2861-2868.
13. Sinclair I.J.B. The Role of Complement in the Immune Reactions of Paramecium aurelia and Tetrahymena pyriformis. *Immunology*, 1958, Vol. 1, no. 3, pp. 291-299.
14. Song C., Dinan T., Leonard B.E. Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls. *J. Affect. Disord.*, 1994, Vol. 30, no. 4, pp. 283-288.
15. Spivak B., Radwan M., Brandon J., Baruch Y., Stawski M., Tyano S., Weizman A. Reduced total complement haemolytic activity in schizophrenic patients. *Psychol. Med.*, 1993, Vol. 23, no. 2, pp. 315-318.

Авторы:

Черемных Е.Г. — к.т.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Иванов П.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Фактор М.И. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Карпова Н.С. — младший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Васильева Е.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Гусев К.В. — врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Брусов О.С. — к.б.н., заведующий лабораторией биохимии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Authors:

Cheremnykh E.G., PhD (Technology), Senior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Ivanov P.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Faktor M.I., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Karpova N.S., Junior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Vasiljeva E.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Gusev K.V., Clinical Chemist (Laboratory Diagnostics), Clinical Laboratory, N.A. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital № 1, Moscow, Russian Federation

Brusov O.S., PhD (Biology), Chief, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.03.2015

Отправлена на доработку 11.03.2015

Принята к печати 06.04.2015

Received 05.03.2015

Revision received 11.03.2015

Accepted 06.04.2015