



УДК 577.15.08

ИЗОТИПИРОВАНИЕ КОМПОНЕНТА С4 КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧИЙ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОТИПОВ С4А И С4В

© 2000 г. Л. В. Козлов*, В. М. Лахтин, Т. Г. Скороходова, Т. Н. Баталова, Б. Б. Шойбонов, В. Л. Дьяков, В. А. Гузова, Н. С. Матвеевская

Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Поступила в редакцию 25.08.99 г. Принята к печати 15.03.2000 г.

Для определения соотношения изотипов А и В компонента С4 комплемента человека и обнаружения врожденного дефицита изотипов использовано различие в их функциональной активности. Разработаны иммуноферментные методы определения количества компонента С4 (обычный сэндвич-метод) и его функциональной активности. При определении функциональной активности осуществлялась активация классического пути комплемента и, тем самым, компонента С4 на активаторах, сорбированных на микропанели для иммуноферментного анализа: иммуноглобулине IgG3 человека или липополисахариде клеточных стенок *Shigella sonnei* (способного активировать комплемент благодаря связыванию компонента С1). Образующийся активированный фрагмент С4b ковалентно связывается на мишени-активаторе, при этом С4Ab лучше связывается с белковой мишенью (иммуноглобулином), а С4Vb – с углеводной (липополисахаридом). Поэтому в методе, в котором активатором и мишенью служит иммуноглобулин, связывается и определяется изотип С4А, а при активации комплемента липополисахаридом – изотип С4В. Соотношение активностей, определенных двумя методами, позволяет судить о наличии или отсутствии дефицитов отдельных изотипов компонента С4. В описанных методах использовали кроличьи поликлональные моноспецифические антитела к компоненту С4 человека и конъюгат этих антител с пероксидазой хрена.

Ключевые слова: система комплемента, изотипы С4А и С4В, определение функциональной активности; иммуноферментный метод.

Компонент С4 системы комплемента по его количеству в крови и по функциональной важности представляет собой наряду с компонентом С3 ключевое соединение в эффекторном действии комплемента. Как и С3, он участвует в опсонизации иммунных комплексов, поскольку после активации также экспонирует ацилирующую тиолсложноэфирную группу, а после ковалентного связывания на иммунном комплексе или другой мишени является маркером для их узнавания CR2-рецепторами в процессах иммунного ответа или CR1-рецепторами в процессах клиренса. При активации системы С4 участвует в формировании С3- и С5-конвертаз классического пути, в то время как С3 формирует С3-конвертазу альтернативного пути и С5-конвертазу обоих путей [1]. С4 принадлежит к антигенам класса III главного комплекса гистосовместимости. Существенной особенностью компонента С4 является наличие двух изотипов С4А и С4В – продуктов двух генов, характеризующихся высоким полиморфизмом [2]. С4А соответствует антигену группы крови Rod-

gers, а С4В – Chido [3]. Относительно высока частота (в норме до 15%) встречаемости нулевых молчащих аллелей *C4AQ0* и *C4BQ0* [2]. Таким образом, около 30% индивидуумов имеют пониженное содержание одного из изотипов компонента С4 – синтез его при этом осуществляется только одним из двух генов, полученных от родителей (случай гетерозиготности). Полное отсутствие данного изотипа (случай гомозиготности) встречается гораздо реже.

Различия в химическом строении изотипов – присутствие в молекуле С4В в непосредственной близости от тиолсложноэфирной связи остатка гистидина и отсутствие такого каталитического остатка в молекуле С4А – приводят к различиям в химической активности и специфичности этих изотипов: С4А после активации ацилирует белки (аминные нуклеофилы) существенно с более высокой скоростью, чем С4В, в то время как С4В быстрее взаимодействует с углеводами (гидроксильные нуклеофилы) по сравнению с С4А [1].

Такие отличия в активности и специфичности изотипов С4 обуславливают неодинаковый ответ комплемента на активацию иммунными комплек-

*Автор для переписки (e-mail: l.v.kozlov@mtu-net.ru).

сами в зависимости от того, аминные или гидроксильные нуклеофилы преобладают в антигене, участвующем в образовании иммунного комплекса. Кроме того, опсонизированные иммунные комплексы, образованные белковым антигеном, несут на своей поверхности преимущественно C4Ab-фрагменты, а образованные углеводным антигеном – C4Bb-фрагменты. Судьба опсонизированных иммунных комплексов может несколько различаться, поскольку рецептор комплемента CR1, играющий важную роль в клиренсе иммунных комплексов, значительно лучше связывает активированный C4Ab, чем C4Bb [4].

Все эти обстоятельства могут, по-видимому, объяснить имеющиеся в литературе [5] сведения о повышенной частоте встречаемости нулевых аллелей при различных заболеваниях, связанных с нарушениями в формировании и удалении иммунных комплексов. Так, нулевые аллели C4 часто встречаются при таких тяжелых заболеваниях, как системная красная волчанка [6], диабет [7], хронический гепатит [8]. Носители нулевых аллелей C4 имеют повышенный риск не пережить критический возрастной период (53–62 года) [9]. Следует отметить, что не все болезни были исследованы на частоту встречаемости дефицитов изоформ C4. Это объясняется тем, что изотипирование по C4 не стало еще достоянием широкой клинической практики из-за сложности методов таких анализов и их высокой стоимости. В мире в настоящее время имеется лишь полтора десятка референс-лабораторий, проводящих эти исследования [2].

Отмеченные выше различия в функциональной активности изоформ послужили основой для разработки методов изотипирования компонента C4 комплемента человека. Одним из подходов могло быть определение удельной активности

компонента C4. Для определения функциональной активности C4 в настоящее время используется исключительно гемолитический метод, который, по-видимому, отражает прежде всего активность C4B [10], поскольку поверхность эритроцитов, по утверждению Лоу, Доддса и Портера [10], богата полисахаридами. Для определения активности C4A практического метода до сих пор не существовало.

В связи с этим необходимо было разработать адекватные и, желательно, единообразные методы определения активностей изоформ C4A и C4B и суммарного количества компонента C4. Таковыми стали иммуноферментные методы, ранее не применявшиеся для определения функциональной активности компонентов комплемента.

Выделенный из донорской сыворотки и высокоочищенный компонент C4 человека [11] использовался для получения антисыворотки и моноспецифических поликлональных антител кролика. Кроличью антисыворотку применяли в методе радиальной иммунодиффузии (РИД), а антитела – в качестве посадочных антител и в виде конъюгата с пероксидазой хрена для сэндвич-метода в иммуноферментном анализе (ИФА). Оценку количества белка C4 осуществляли по разработанным нами ранее программам для обработки результатов измерений [12]. При введении новых иммуноферментных методов полезно проверять адекватность их результатов путем сравнения с результатами известных методов, не вызывающими сомнений в их достоверности. При этом решаются вопросы калибровки и стандартизации. При сравнении результатов обоих методов (РИД и ИФА) в определении количества C4 видно хорошее совпадение (рис. 1). Следует отметить, что метод РИД – менее точен из-за трудностей измерения диаметров колец преципитации (определяемая концентрация пропорциональна квадрату диаметра), что является причиной возрастания ошибок.

Разработанные иммуноферментные методы определения функциональной активности компонента C4 комплемента человека изоформ C4A (метод А) и C4B (метод В) основаны на способности компонента C4 после активации ковалентно связываться с мишенью. В качестве активатора классического пути в методе А был использован сорбированный в лунках микропанели для ИФА агрегированный моноклональный (миеломный) IgG3 (мишень – белок, связывающий преимущественно C4A. IgG третьего подкласса, как известно, наиболее эффективный активатор классического пути комплемента). В методе В в качестве активатора использован липополисахарид *S. sonnei*, связывающий преимущественно C4B (мишень – углеводная часть).

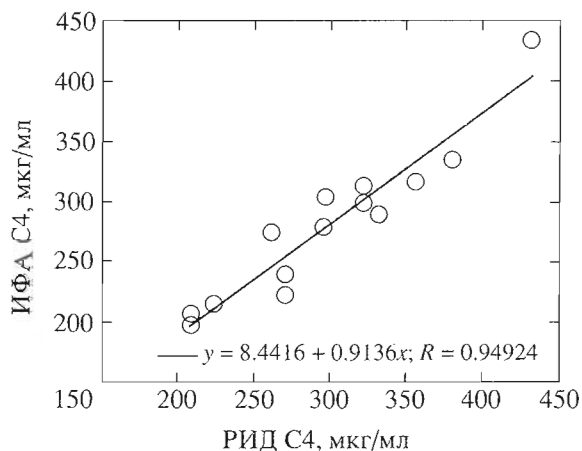


Рис. 1. Сравнение результатов определения содержания белка C4 в сыворотках крови доноров методами радиальной иммунодиффузии (РИД) и иммуноферментным методом (ИФА).

В качестве источника компонента C1 (активная форма которого активирует C4) первоначально использовали реагент R4, т.е. компонент, лишенный четвертого компонента, полученный из сыворотки морской свинки [13]. Однако проведенные исследования показали, что источником C1 в этом методе анализа может служить и цельная сыворотка морской свинки, поскольку оказалось, что полученные кроличьи антитела против C4 человека не реагируют с компонентом C4 и другими белками сыворотки морской свинки. Применение избытка компонента C1 позволяет определять активность C4 не только в составе сыворотки крови, но и индивидуального, т.е. в растворах, в которых другие компоненты комплемента, в частности C1, не содержатся.

При инкубации в лунках микропанели, покрытых IgG3 (метод А), сыворотки морской свинки и растворов, содержащих функционально активный C4 человека, происходит активация и ковалентное связывание компонента C4 в виде его фрагмента C4b с иммуноглобулином, покрывающим поверхность лунки. Как мы предполагаем, преимущественно связывается изотип C4A, обладающий большей специфичностью к белкам мишени (аминному нуклеофилу). Количество компонента C4, ковалентно связавшегося в результате активации, определяют с помощью IgG-антител к C4, ковалентно связанных с ферментом – пероксидазой хрена (по продукту ферментативной реакции, субстрат *o*-фенилендиамин). В контрольных экспериментах было показано, что связывается только функционально активный компонент C4, образующийся в результате активации. Так, C4, инактивированный нагреванием, или C4 в присутствии EDTA (когда активация компонента C1 невозможна вследствие его диссоциации на субкомпоненты) не связывались на микропанели. Мы показали, что для активации комплемента в этом методе могут использоваться не только IgG3, но и суммарный IgG, а также IgM человека без предварительной агрегации, поскольку необходимая для активации комплемента агрегация иммуноглобулинов происходит уже при сорбции их на полистирольной поверхности микропанели [14].

Следует отметить, что для определения содержания функционально активного C4 методом ИФА разработана принципиально другая программа компьютерного расчета, отличающаяся от предложенной ранее [12]. В традиционном методе ИФА (сэндвич-метод) связывание определяемого антигена на “посадочных” антителах происходит в результате равновесного взаимодействия, характеризуемого константой связывания с антителами, и зависимость количества сорбированного антигена от его концентрации в растворе подчиняется уравнению Лэнгмюра. При определении функциональной активности C4 активиро-

ванный C4b ковалентно связывается на “нуклеофильной мишени”, сорбированной в лунках микропанели. Поэтому количество связавшегося за время реакции C4b прямо пропорционально концентрации исходного активного C4 в растворе и в основу алгоритма для расчета концентрации функционально активного C4 в этом методе положена линейная регрессия.

Определения проводились в условиях постоянной избыточной концентрации компонента C1 (в виде сыворотки морской свинки). В качестве стандарта использовали пул из 10 донорских сывороток, в котором определяли количественное содержание суммарного белка C4. Поэтому результаты определения активности C4A (и далее аналогично C4B) условно выражали в мг/мл суммарного белка C4-стандарта, обладающего такой же активностью соответствующего изотипа, как и в определяемом образце. Получить идеальный стандарт практически невозможно, поскольку по мере очистки компонента C4 его активность неизбежно падает из-за протекающего спонтанного процесса инактивации.

На рис. 2 показано соответствие активности C4A-изотипа компонента C4 содержанию белка C4 в сыворотках крови доноров. Эти данные свидетельствуют о примерно одинаковой удельной активности компонента C4A в крови доноров, поскольку наблюдается линейная зависимость активности компонента от содержания белка.

Для определения функциональной активности C4B (метод В), как сказано выше, проводили сорбцию в лунках микропанели липополисахарида клеточных стенок грамотрицательных микроорганизмов *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* или *Neisseria meningitidis*. Способность липополисахаридов служить активаторами системы комплемента была изучена ранее [15]. Кроме того, специально проверялась эффективность используе-

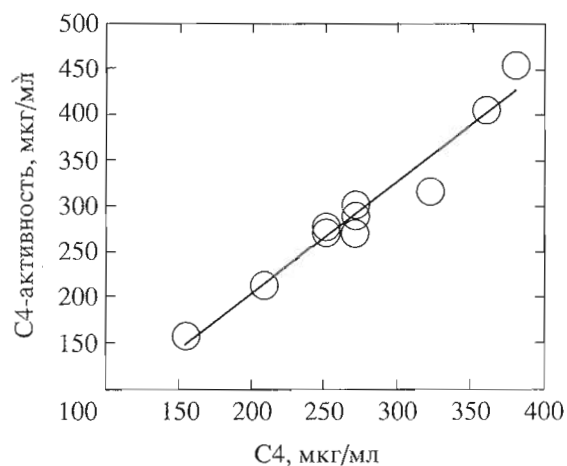


Рис. 2. Корреляция функциональной активности C4A и содержания белка C4 в крови доноров.

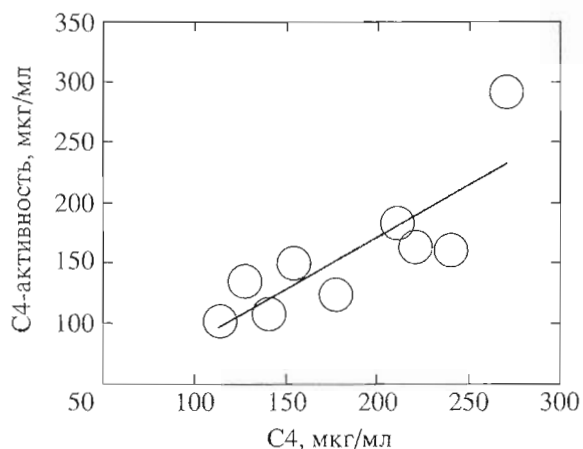


Рис. 3. Корреляция функциональной активности С4В и содержания белка С4 в крови доноров.

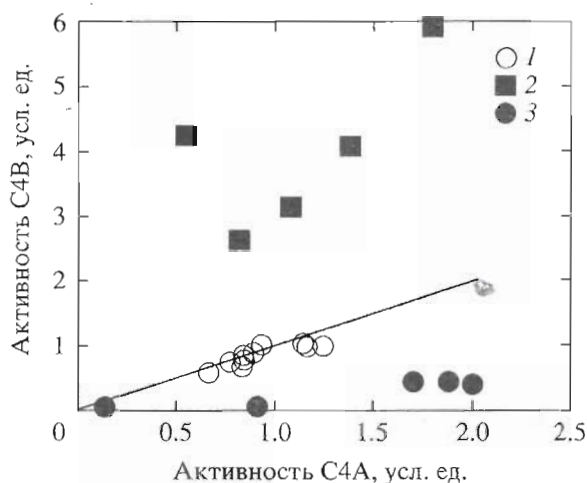


Рис. 4. Сравнение активностей изоформ С4А и С4В в сыворотках крови доноров (1), больных ревматоидным артритом или язвой желудка (2) и системной красной волчанкой или носителей дифтерии (3). Активность выражена в условных единицах – за 1 усл. ед. принимали среднюю активность каждого изоформа в сыворотках доноров.

мых препаратов ЛПС в активации классического пути комплемента описанным ранее методом [15]. Считается, что липид А способен связывать компонент С1 [16], при этом мишенью для ковалентного присоединения активированного компонента С4 является, по-видимому, углеводная часть молекулы липополисахарида. В остальном определение функциональной активности компонента С4 (в данном случае С4В-изоформа) проводилось аналогично определению С4А, включая и метод расчета.

На рис. 3 приведены данные, свидетельствующие о корреляции между функциональной активностью С4В-изоформа компонента С4 и содержанием белка в сыворотках крови доноров. По-

скольку сыворотка крови хранилась некоторое время до определения активности С4, возможно, за время хранения произошло падение функциональной активности этого компонента в некоторых образцах. Известна высокая лабильность компонента С4, обусловленная наличием в интерьере молекулы тиолсложноэфирной связи, способной к ацилированию нуклеофильных групп и к быстрому гидролизу водой при экспонировании. При этом скорость инактивации С4В, обусловленной неферментативным гидролизом тиолсложноэфирной связи, в десять раз превосходит скорость инактивации С4А [17]. Вероятно, это и является причиной большего разброса точек на рис. 3 по сравнению с данными рис. 2 для С4А.

Значительных различий в активностях изоформ С4А и С4В следует ожидать при наличии наследственных нулевых аллелей *C4AQ0* или *C4BQ0*. Эти дефициты наиболее характерны для аутоиммунных заболеваний. Для обнаружения таких различий было проведено определение активностей С4А и С4В в 10 сыворотках доноров крови (рис. 4, 1) и в 10 сыворотках больных – ревматоидным артритом или язвой желудка (рис. 4, 2), системной красной волчанкой или бактерионосителями дифтерии (рис. 4, 3). Характерно, что для здоровых лиц (предположительно в отсутствие дефицитов изоформ С4) на графике, где по оси абсцисс откладывалась активность С4А, а по оси ординат – С4В для каждого образца сыворотки, точки ложились на прямую. Это означало, что независимо от общего содержания белка С4 в сыворотке крови здоровых лиц, соотношение активностей С4А и С4В было одинаковым. Выпадение точек из прямолинейной зависимости могло характеризовать наличие дефицитов либо по С4А (рис. 4, 2), либо по С4В (рис. 4, 3).

Для проверки адекватности предложенного метода выявления дефицитов С4А и С4В было проведено подтверждение наличия обнаруженных дефицитов описанными электрофоретическими методами. Известно, что после десалирования изоформы С4А и С4В лучше всего разделяются при электрофорезе в ступенчатом буферном градиенте (“discontinuous”) в агарозном геле [18], при этом С4А быстрее движется к аноду, чем С4В, что отражено в их названии А – “acidic”, В – “basic”. Был проведен диск-электрофорез в агарозном геле с последующим выявлением антигенов С4 либо перекрестным иммуноэлектрофорезом [19], либо иммунодиффузией, как это делается в традиционном иммуноэлектрофорезе, с использованием кроличьей антисыворотки против компонента С4 человека. На рис. 5 приведены электрофореграммы четырех сывороток больных с дефицитами С4А (две сыворотки) и С4В (также две). Наличие этих дефицитов коррелирует с данными, полученными в результате определения функцио-

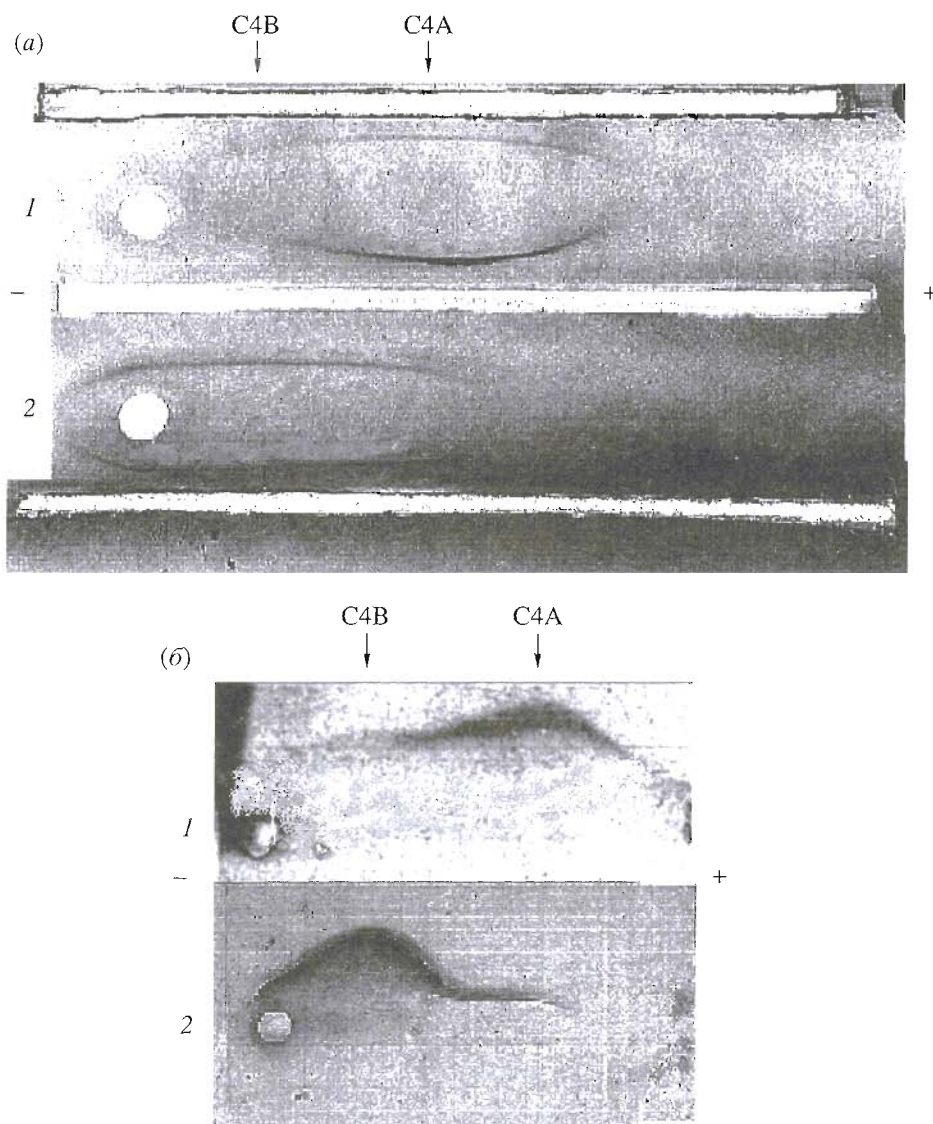


Рис. 5. Иммуноэлектрофорез (*а* – обычный, *б* – перекрестный) с антисывороткой против компонента С4 человека сывороток, дефицитных (по данным ИФА) по С4В (1) и С4А (2).

нальной активности иммуноферментными методами.

Поскольку снижение функциональной активности С4 может наблюдаться в результате потребления комплемента в воспалительном процессе или вследствие вообще сниженной его продукции, то в качестве критерия наследственного дефицита какой-либо из изоформ С4 мы предложили оценивать соотношение активностей С4А и С4В, каждая из которых определялась своим специфическим методом, описанным выше. Потребление комплемента в результате его активации приводит к снижению обеих активностей – С4А и С4В, поэтому врожденный дефицит может быть обнаружен на уровне и высокого, и низкого содержания белка С4, что проявляется в соотноше-

нии этих активностей. Теоретически можно ожидать, что при гетерозиготном дефиците одного из изоформ, когда его активность падает в 2 раза, соотношение активностей становится равным 0.5 или 2 по сравнению с 1 в бездефицитном случае. Это определяется наличием четырех функционирующих генов (С4А и С4А от отца и они же от матери), поэтому дефицит лишь по одному из генов снижает вдвое активность данного изоформа. Более редкий гомозиготный дефицит приводит к еще большей разбалансировке активностей, поэтому соотношение активностей становится или меньше 0.5 или выше 2. Строго говоря, внутри каждого изоформа могут происходить небольшие колебания активностей из-за аллотипических различий, но, как показывает опыт, эти колебания, по-видимому, несущественны для наших оп-

Выявление дефицитов С4А и С4В иммуноферментными методами (ИФА) и иммуноэлектрофорезом (ИЭФ)

Номер сыворотки	Отношение активностей, определенных методами А и В (В/А, % нормы)	Дефициты, выявленные ИФА	Дефициты, выявленные ИЭФ
1	10	С4В	С4В
2	65	–	–
3	82	–	–
4	83	–	–
5	88	–	–
6	89	–	–
7	108	–	–
8	190	С4А	С4А
9	203	С4А	С4А
10	483	С4А	С4А

ределений. Наконец, весьма редко встречающийся дефицит по обоим изотипам одновременно не приводит к изменению нормального соотношения активностей, однако и он может быть дифференцирован по низкой активности обоих изотипов.

При проведении изотипирования компонента С4 предлагаемым иммуноферментным методом в качестве стандарта брали пул из 10 сывороток здоровых доноров (наличие возможных дефицитов в отдельных сыворотках в таком случае не вносит большой погрешности) и соотношение активностей С4А и С4В принимали за норму (100%). Данные по выявлению дефицитов в сыворотках 10 больных лиц иммуноферментными и иммуноэлектрофоретическими методами приведены в таблице. Как следует из данных таблицы, при отношении активностей компонента С4, определенных методами А и В (В/А), составляющих менее 50% от стандартного, имеется дефицит изотипа С4В, а при отношении активностей в 200% от нормы и выше имеются дефициты С4А.

Метод изотипической характеристики С4 на основе иммуноферментного определения функциональной активности С4А и С4В используется нами для выявления связи дефицитов с предрасположенностью к различным заболеваниям. Этот метод был применен для определения дефицитов С4А и С4В в сыворотках больных ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, а также (впервые) больных глаукомой и хламидиозом. Повышение частоты дефицитов С4, наблюдаемое у больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой, соответствовало данным литературы. Установлена повышенная частота встречаемости дефицита С4В у больных глаукомой и хламидиозом [20].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали компьютерные программы для методов ИФА и РИД, реализуемые ООО “Микрофлора” при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 96-луночные плоскодонные микропанели отечественного производства (ГОСНИИ-МЕДПОЛИМЕР, г. Москва), Твин-20 (Sigma, США), нейраминидазу из *Clostridium perfringens* (Sigma, США), пероксидазу хрена НПО “Биохим-реактив” (г. Олайне, Латвия), остальные реактивы – отечественного производства качества не ниже “ч.д.а.”. Реагенты R4 и R1 готовили по стандартным методикам [13]. Стандарт С4 для радиальной иммунодиффузии и пластины с гелем агарозы и козьей антисывороткой, моноспецифичной к компоненту С4 человека, – производства Оксфордской лаборатории “DIFFU-GEN” (Фостер Сити, США). Конъюгаты кроличьих IgG-антител к С4 человека с пероксидазой получали традиционными методами [21]. IgG3 выделяли из сыворотки крови больного множественной миеломой хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman, Великобритания). Липополисахариды *S. sonnei* и *E. coli*, полученные водно-фенольной экстракцией по Вестфалу [22], любезно предоставлены З.П. Белкиным, а липополисахарид *N. meningitidis* – В.И. Кувакиной (МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского).

Получение высокоочищенных компонентов С3 и С4 компонента человека [11, 23]. Нормальную донорскую сыворотку крови человека (100 мл) подкисляли 0.15 М HCl до pH 5.0 и диализовали против 10 л дистиллированной воды при +4°C в течение 18 ч, затем центрифугировали. Надосадочную жидкость (псевдоглобулиновую фракцию) использовали в дальнейшем для получения компонента С4. Осадок растворяли в 30 мл 0.01 М медуналового буфера, содержащего 1 мМ ε-аминокапроновую кислоту, 1 мМ EDTA и 0.75 М NaCl, pH 8.6–9.0. Нерастворившиеся примеси отделяли центрифугированием и отбрасывали. Раствор диализовали против 3 л 0.01 М медуналового буфера, содержащего 1 мМ ε-аминокапроновую кислоту, 1 мМ EDTA, pH 8.6–9.0, при +4°C в течение 18 ч. Осадок отделяли центрифугированием, а к супернатанту добавляли при перемешивании безводный сульфат натрия (из расчета 20 г на 100 мл раствора), поддерживая температуру 37°C, пока весь сульфат не растворился. Выпавший С3 через 2 ч стояния при комнатной температуре отделяли центрифугированием, осадок промывали дважды раствором сульфата натрия (20 г на 100 мл) с центрифугированием и растворяли в 30 мл буферного раствора состава 11% Na₂SO₄, 0.005 М Na₂HPO₄, 0.01 М EDTA, 5 мМ азид натрия, pH 6.0. Через 2 ч перемешивания при комнатной температуре раствор центрифугировали для отделения от нерастворившихся примесей, подкисляли 0.15 М HCl до

pH 5.0 и диализовали при +4°C против дистиллированной воды. Выпавший осадок представлял собой функционально активный по данным гемолитического определения компонент С3, который, по данным иммуноэлектрофореза, давал одну полосу преципитации в области β_2 -глобулинов с антисывороткой ко всем сывороточным белкам человека и не содержал примесей по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Выход по белку – 46 мг (60%).

Псевдоглобулиновую фракцию наносили на колонку с DEAE-сефацелом (Pharmacia, Швеция), уравновешенным 0.01 М фосфатным буфером, pH 7.4, содержащим 10 мМ ϵ -аминокапроновую кислоту. После промывания колонки тем же буфером белки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (до 0.5 М) в том же буфере. Последний белковый пик содержал компонент С4. Эту фракцию концентрировали, диализовали против 0.01 М фосфатного буфера, pH 7.4, и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефакрилом S-200 (Pharmacia) в том же буфере. Фракции, содержащие С4, хранили при –20°C. Препарат представлял собой функционально активный по данным гемолитического определения компонент С4 [13], который, по данным иммуноэлектрофореза, давал одну полосу преципитации в области β_1 -глобулинов с антисывороткой ко всем сывороточным белкам человека и не содержал примесей по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Выход по белку – 9 мг (30%).

Получение кроличьих антител к компоненту С4 компонента человека. Раствор 1 мг высокоочищенного компонента С4 компонента человека в 1 мл изотонического фосфатного буфера, pH 7.4, тщательно перемешивали с 1 мл полного адъюванта Фрейнда (Difco Lab., США) и вводили внутримышечно кроликам в 10 точек спины. Иммунизацию повторяли с полным адъювантом Фрейнда 2–3 раза через 10 сут. Через 10 сут после последней иммунизации забирали кровь из ушной вены. Иммунную сыворотку контролировали на наличие антител к сывороточным белкам человека стандартным методом иммуноэлектрофореза [24]. Если иммунная сыворотка выявляла в нормальной сыворотке человека только одну полосу компонента С4 в зоне β_1 -глобулинов и не содержала антител к другим белкам сыворотки человека, такую антисыворотку считали моноспецифичной и использовали для выделения фракции IgG хроматографией на DEAE-целлюлозе. Если же иммунная сыворотка в иммуноэлектрофорезе давала дополнительную линию преципитации (как правило, с компонентом С3), то ее истощали по анти-С3-антителам добавлением препарата компонента С3.

Фракцию IgG-антител выделяли из иммунной сыворотки хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-32 (Whatman, Великобритания).

Определение количества компонента С4 методом иммуноферментного анализа. Растворяли кроличьи анти-С4-иммуноглобулины в 0.05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9.5, в концентрации 100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового планшета с повышенной сорбционной емкостью, закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Дважды отмывали лунки планшета изотоническим фосфатным буфером, pH 7.4 (PBS), содержащим 0.05% Твина-20 (PBS-Твин), по 150 мкл на лунку, осушали планшет и в каждую лунку вносили по 100 мкл PBS, содержащего Твин и 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), и оставляли на 30 мин при 37°C, после чего содержимое лунок вытряхивали. В ряды лунок вносили по 100 мкл раствора, содержащего С4 в растворе PBS-Твин-BSA с 50 мМ EDTA, в виде прогрессивных двукратных разведений. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмывки PBS-Твин и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против С4 человека в том же буфере в подобранном разведении. Затем после инкубации в термостате 1 ч при 37°C, двукратной отмывки PBS-Твин и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного буфера (10 мг *o*-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% H₂SO₄. Результаты реакции учитывали измерением оптического поглощения при 492 нм с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом. Для оценки количества белка С4 использовали разработанные ранее программы для обработки данных измерений [12].

Определение функциональной активности С4А (метод А). Растворяли иммунохимически чистый IgG3, или суммарный IgG, или IgM, или их агрегаты, полученные предварительным нагреванием при 63°C, в 0.05 М натрий-карбонатном буфере, pH 9.5, в концентрациях 10–100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета. Закрывали крышкой и оставляли на ночь при 4°C. Два раза отмывали планшет вероналовым буферным раствором, pH 7.4, содержащим 0.15 М NaCl, 0.15 мМ Ca²⁺ и 0.5 мМ Mg²⁺ (VBS²⁺), по 150 мкл в каждую лунку, затем планшет осушали путем вытряхивания остатка жидкости. В 8 лунок каждого вертикального ряда планшета вносили по 100 мкл раствора, содержащего С4 в растворе VBS²⁺, в виде прогрессивных двукратных разведений. Во все лунки планшета вносили по 10 мкл сыворотки морской свинки. После инкубации в термостате в

течение 1 ч при 37°C, двукратной отмытки фосфатным буфером, рН 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 С4 человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмытки с детергентом и осушения планшета в каждую лунку вносили по 100 мкл субстратного буфера. После 30 мин инкубации в темноте реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл 14% H₂SO₄. Результаты реакции учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 492 нм. Функциональную активность препарата С4 рассчитывали с помощью компьютерной программы, в качестве стандарта использовали пул из 10 сывороток доноров.

Определение функциональной активности С4В (метод В). Растворяли препарат липополисахарида *S. sonnei*, или *E. coli*, или *N. meningitidis* в 0.05 М натрий-карбонатном буфере, рН 9.5, в концентрациях 10–100 мкг/мл и вносили по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета. Закрывали крышечкой и оставляли на ночь при 4°C. Далее все операции проделывали аналогично методу А.

Определение изотипов С4-компонента комплекса в сыворотках больных аутоиммунными заболеваниями (наиболее часто имеющими дефициты). После определения функциональной активности С4А и С4В методами А и В делили полученное значение активности С4В на значение для С4А (В/А) и вычисляли процент от стандартного соотношения, определенного для пула сывороток 10 доноров крови. Значения отношения активностей С4В к С4А в 2 и более раз выше или в 2 и более раз ниже стандарта, полученного для пула из 10 сывороток здоровых доноров, означали наличие соответственно дефицитов С4А или С4В.

Электрофоретическое определение изотипов С4А и С4В компонентов комплекса [18, 19]. Образцы сывороток крови предварительно десалировали, инкубируя в течение 18 ч при 37°C в присутствии 3 ед./мл нейраминидазы из *S. perfri-gens* и 5 мМ EDTA. Стеклоянную пластину заливали 1.5% раствором агарозы, приготовленным на вероналовом буфере, рН 8.6, с ионной силой 0.022, содержащем 0.02 М EDTA. Обработанные образцы сывороток вносили в подготовленные лунки в геле по 8 мкл. В электродные сосуды заливали вероналовый буфер, рН 8.6, с ионной силой 0.065 и проводили электрофорез в течение 2.5–4 ч при напряжении 20 В/см. Для детектирования белков компонента С4 либо вырезали в агарозном геле борозды параллельно миграции белков, в эти борозды заливали моноспецифическую антисыворотку к компоненту С4 и выявля-

ли зоны преципитации как в обычном иммуноэлектрофорезе, либо вырезали слой агарозы с разделившимися белками (катодная часть геля), переносили на нижнюю часть стеклянной пластины, верхнюю часть заливали смесью 3% агара в 0.03 М вероналовом буфере, рН 8.6, с антисывороткой к компоненту С4 и проводили электрофорез в вертикальном направлении при напряжении 1.5 В/см в течение 18 ч, как в перекрестном иммуноэлектрофорезе. Образовавшиеся полосы преципитации в виде “ракеток” соответствовали изотипам С4, а их высота – количеству каждого из изотипов. В обоих случаях полосы преципитации окрашивали 1% амидо-черным как обычно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Low S.K.A., Dodds A.W. // Protein Science. 1997. V. 6. P. 265–274.
2. Mauff G., Alper C.A., Awdeh Z., Batchelor R., Bertrams J., Bruun-Petersen G., Dawkins R.L., Démant P., Edwards J., Grosse-Wilde H., Hauptmann G., Klou-da P., Lamm L., Mollenhauer E., Nerl C., Olaisen B., O'Neill G., Rittner C., Roos M.H., Skanes V., Teis-berg P., Wells L. // Immunobiology. 1983. V. 164. P. 184–191.
3. O'Neill G.J., Yang S.Y., Tegoli J., Berger R., Du-pont B. // Nature. 1978. V. 273. P. 668–670.
4. Reilly B.D., Mold C. // Clin. Exp. Immunol. 1997. V. 110. P. 310–316.
5. Brai M., Accardo P., Bellavia D. // Ann. Ital. Med. Int. 1994. V. 9. P. 167–172.
6. Fielder A.H., Walport M.J., Batchelor J.R., Rynes R.J., Black C.M., Dodi I.A., Hughes G.R. // Br. Med. J. 1983. V. 286. P. 425–428.
7. Bertrams J., Hintzen U., Schlicht V., Schoeps S., Gries F.A., Louton T.K., Baur M.P. // Immunobiology. 1984. V. 166. P. 335–344.
8. Vergani D., Wells L., Lacher V.F., Nasaruddin B.A., Davies E.T., Mieli-Vergani G., Mowat A.P. // Lancet. 1985. V. 2. P. 294–298.
9. Kramer J., Rajczyk K., Füst G. // Immunology Letters. 1989. V. 20. P. 83–86.
10. Law S.K.A., Dodds A.W., Porter R.R. // EMBO J. 1984. V. 3. P. 1819–1823.
11. Козлов Л.В., Шибанова Е.Д., Зинченко А.А. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 660–666.
12. Козлов Л.В., Баталова Т.Н., Фаддеева Т.В., Панурина Р.Л. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 635–641.
13. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П., Молчанова Н.Н. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. С. 652–659.
14. Козлов Л.В., Сизой М.Н., Зинченко А.А., Иванов А.Е., Зубов В.П. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. С. 1629–1638.
15. Козлов Л.В., Зинченко А.А., Соляков Л.С., Сизой М.Н., Ищенко А.М., Мартюшин С.В., Андреев С.В. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 1047–1055.
16. Morrison D.C., Kline L.F. // J. Immunol. 1977. V. 118. P. 362–368.

17. Sepp A., Dodds A.W., Anderson M.J., Campbell R.D., Willis A.C., Law S.K. // *Protein Science*. 1993. V. 2. P. 706–716.
18. O'Neill G.J., Yang S.Y., Dupont B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. P. 5165–5169.
19. Awdeh Z.L., Raum D., Alper C.A. // *Nature*. 1979. V. 282. P. 205–207.
20. Скороходова Т.Г., Козлов Л.В., Баталова Т.Н., Лахтин В.М. // *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999. № 9. С. 34.
21. Getty D., Raykundalia C., Houba V. // *WHO IMM/PIR*. 1983. № 83.1.
22. Westphal O., Jann K. // *Methods in Carbohydrate Chemistry*. / Ed. R.L. Wistler. New York: Academic Press, 1965. V. 5. P. 83–91.
23. Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Мишин А.А., Гузова В.А., Баталова Т.Н., Лысакова С.В. Способ получения компонента C3 комплемента человека // Патент № 2144365 (Россия). 2000. Бюл. № 2.
24. Ouchterlony O., Nilsson L.-A. // *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford: Blackwells, 1978. V. 1. P. 19.1–19.44.

Isotyping of Component C4 of Human Complement Using Differences in the Functional Activity of Isotypes C4A and C4B

L. V. Kozlov[#], V. M. Lakhtin, T. G. Skorokhodova, T. N. Batalova,
B. B. Shoibonov, V. L. D'yakov, V. A. Guzova, and N. S. Matveevskaya

*Gabrichievskii Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
ul. Admirala Makarova 10, Moscow, 125212 Russia*

The difference in the functional activity of the isotypes A and B of component C4 of human complement was used to determine their ratio and to detect the inherited deficiency of the isotypes. ELISA methods were developed for the quantitative assay of component C4 (conventional sandwich method) and its functional activity. When determining the functional activity, the classic pathway of the complement and therefore of component C4 was activated by activators sorbed on ELISA microplates (immunoglobulin IgG3 or liposaccharide of the *Shigella sonnei* cell walls, which activates the complement by binding component C1). The nascent fragment C4b is covalently bound to the target activator; C4Ab binds better to the target protein (immunoglobulin), and C4Bb to the target carbohydrate (liposaccharide). Therefore, when immunoglobulin is a target activator, isotype C4A is bound and determined; and when the complement is activated by liposaccharide, isotype C4B is determined. The ratio of the activities determined by the two methods indicates a deficiency in the individual isotypes of component C4 or its absence. The rabbit polyclonal monospecific antibodies against the human component C4 and the conjugates of these antibodies with horseradish peroxidase were used in the methods described.

Key words: complement system, isotypes C4A and C4B, functional activity assay, ELISA

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: l.v.kozlov@mtu-net.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 7. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.