

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Динаміка зміни продукції білків системи комплементу та її
гемолітичної активності у відповідь на цитотоксичні компоненти
сироватки крові**

Допущена до захисту

«__» _____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота

студента кафедри

молекулярної біології та біотехнології

Воловенко Даніла В'ячеславовича

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__» _____ 2024 р.

Науковий керівник:

д.б.н., професор Клімова О.М.

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Динаміка зміни продукції білків системи комплементу та її гемолітичної активності у відповідь на цитотоксичні компоненти сироватки крові».

Робота включає: 52 сторінки, використаних джерел – 31, рисунків – 14, таблиць – 4.

Фундаментальні дослідження в біотехнології розглядають проблеми регуляції імунної відповіді.

Важливим є розробка біологічних-терапевтичних препаратів котрі корегують імунний дисбаланс, що лежить в основі багатьох небезпечних захворювань пов'язаних з розвитком локальних хронічних запальних реакцій і системним запаленням. До таких захворювань відноситься гепатоспленомегалія.

Розуміння того, як система комплементу реагує на цитотоксичні компоненти сироватки крові, може мати важливе значення для розвитку додаткових методів діагностики та лікування тяжких захворювань, таких як аутоімунні або інфекційні та запальні патології.

Мета роботи: оцінка відповіді гуморального імунітету і спектральна характеристика сироваткових компонентів при аутоімунній патології печінки та селезінки.

Для досягнення мети було проведено літературний аналіз стосовно властивостей, функцій, механізмів активації та дії білків системи комплементу. Проаналізовано вплив ендогенних чинників такі як асоційовані з пошкодженням молекулярні патерни (DAMP) на концентрацію білків системи комплементу. Також були розглянуті експериментальні дані отримані іншими дослідниками для пацієнтів з абдомінальною патологією (гепатоспленомегалією) на тлі герпетичної інфекції (вірус Ебштейна-Бар VEB, цитомегаловірус CMV)

Для виконання цієї роботи використовувались методи дослідження концентрації DAMP, білків системи комплементу (C3 та C4), їх гемолітичної активності у сироватці крові пацієнтів, а також спектральний аналіз сироватки методом УФ-спектроскопії.

Результати дослідження порівнювались із референтними значеннями внаслідок чого було проведено кореляційний аналіз між зміною вмісту та гемолітичної активності компонентів комплементу і різницею поглинання у спектрі при $\lambda = 260$ нм (нуклеотидна фракція)

Ключові слова: *білки системи комплементу, гепатоспленомегалія, DAMP, гемолітична активність, спектральна характеристика*

ABSTRACT

Qualification work on the topic: "Dynamics of changes in the production of complement system proteins and its hemolytic activity in response to cytotoxic components of blood serum".

The work includes: 52 pages, used sources – 31, figures – 14, tables – 4.

Basic research in biotechnology addresses the problems of immune response regulation.

It is important to develop biological therapeutic drugs that correct the immune imbalance that underlies many dangerous diseases associated with the development of local chronic inflammatory reactions and systemic inflammation. These diseases include hepatosplenomegaly.

Understanding how the complement system reacts to cytotoxic components of the blood serum may be important for the development of additional methods for the diagnosis and treatment of serious diseases, such as autoimmune or infectious and inflammatory pathologies.

The purpose of the work is to evaluate the humoral immune response and spectral characteristics of serum components in autoimmune liver and spleen pathology.

To achieve the goal, a literature analysis was conducted regarding the properties, functions, activation mechanisms, and actions of complement system proteins. The impact of other factors such as damage associated molecular patterns (DAMPs) on the concentration of complement system proteins was analyzed. Experimental data obtained by other researchers for patients with abdominal pathology (hepatosplenomegaly) against the background of herpes infection (Epstein-Barr virus EBV, cytomegalovirus CMV) were also considered.

Methods for investigating the concentration of DAMPs, complement system proteins (C3 and C4), their hemolytic activity in patients' blood serum, as well as spectral analysis of serum using UV spectroscopy, were used for this work.

The results of the study were compared with the reference values, which resulted in a correlation analysis between changes in the content and hemolytic activity of complement components and the difference in absorption in the spectrum at $\lambda = 260$ nm (nucleotide fraction)

Keywords: *complement system proteins, hepatosplenomegaly, DAMP, hemolytic activity, spectral characteristics.*

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень	8
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. Огляд і аналіз наукової літератури	12
1.1 Система комплементу	12
1.1.1 Шляхи активації системи комплементу.....	12
1.1.2 Біологічна дія системи комплементу.	14
1.1.3 Активація білків системи комплементу належить до гуморального фактору вродженого імунітету.	16
1.1.4 Регуляція виробництва білків системи комплементу	17
1.1.5 Вплив системи комплементу на інші елементи імунної системи. 19	19
1.2 Роль системи комплементу в забезпеченні детоксичної ролі печінки та елюмінаційної ролі в селезінці	21
1.3 Вплив DAMP на активацію системи комплементу.....	23
1.4 Методи аналізу системи комплементу	27
1.5 Гепатоспленомегалія.....	29
Розділ 2. Матеріали та методи	32
2.1 Об'єкт дослідження.....	32
2.2 Предмет дослідження.....	32
2.3 Визначення гемолітичної активності комплементу.....	33

2.4	Визначення концентрації C3 та C4 компонентів комплементу	
	34	
2.4.1	Визначення C3 компонента комплементу.	35
2.4.2	Визначення C4 компонента комплементу.	36
2.5	Спектральний аналіз сироватки	37
2.6	Статистична обробка результатів	38
Розділ 3. Результати досліджень		39
3.1	Оцінка гемолітичної активності білків системи комплементу	
	39	
3.2	Оцінка вмісту фрагментів комплементу C3 та C4 в сироватці	
крові	40	
3.3	Оцінка спектральних характеристик в сироватці крові	
цитотоксичних фракцій DAMP (олігопептидна $\lambda = 238$, олігонуклеотидна		
$\lambda = 260$)	43	
3.4	Оцінка кореляційної взаємодії змін концентрації	
комплементу C3 і C4, а також гемолітичної активності сироватки крові з		
особливостями спектральних характеристик фракцій DAMP	45	
Висновки		48
Літературні джерела.....		49

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АН – тест визначення дефіциту системи комплементу альтернативного шляху активації необхідного для певного відсотку лізису пов'язаних з антитілами еритроцитів

C4BP – C4-зв'язуючий білок

CFP – комплемент фактор пропердин

CH – тест визначення дефіциту системи комплементу класичного шляху активації необхідного для певного відсотку лізису пов'язаних з антитілами еритроцитів

CMV – цитомегаловірус

DAF – фактор прискорення розпаду

DAMP – молекулярні патерни асоційовані з пошкодженням

EGTA – етиленгліколь-біс(β-аміноетиловий ефір)-N,N,N',N'-тетраоцтова кислота

ELISA – імуноферментний аналіз

Fas – рецептор «смерті», для полегшення апоптозу

Fc – хвостова частина антитіла, яка зв'язується з відповідним рецептором

HBsAg – поверхневий антиген вірусу гепатиту В

HBV – вірус гепатиту В

Ig - імуноглобулін

IL – інтерлейкін

MASP – манан зв'язуюча лектинсерин пептидаза

PAMP – молекулярні патерни асоційовані з патогенами

PEG – поліетиленгліколь

SP-40 – кластерін

S-протеїн

TFAM – мітохондріальний фактор транскрипції

TH – Т-хелпер

VEB – вірус Епштейна-Барр

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ДУ – державна установа

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

КТ – комп'ютерна томографія

МАК – мембраноатакуючий комплекс

МРТ – магнітно-резонансна томографія

ПНГ – пароксизмальна нічна гемоглобінурія

УЗД – ультразвукове дослідження

УФ - ультрафіолетове

ФДК – фолікули дендритних клітин

ВСТУП

Фундаментальні дослідження в біотехнології розглядають проблеми регуляції імунної відповіді.

Важливим є розробка біологічних-терапевтичних препаратів котрі корегують імунний дисбаланс, що лежить в основі багатьох небезпечних захворювань пов'язаних з розвитком локальних хронічних запальних реакцій і системним запаленням.

Одним із факторів, що індукує запальні реакції в організмі є білки системи комплементу. В тому випадку коли в організмі розвиваються незворотні патологічні стани, що супроводжуються збільшенням в сироватці крові цитотоксичних компонентів DAMP відбувається надлишкове утворення білків системи комплементу котрі можуть викликати несприятливий лізуючий вплив на клітини та тканини організму.

Розуміння того, як система комплементу реагує на цитотоксичні компоненти сироватки крові, може мати важливе значення для розвитку додаткових методів діагностики та лікування тяжких захворювань, таких як аутоімунні або інфекційні та запальні патології.

Наразі триває дослідження молекулярних механізмів, які лежать в основі взаємодії білків системи комплементу з факторами вродженого та адаптивного імунітету і цитотоксичними компонентів сироватки крові. Важливими є оцінка зміни продукції білків системи комплементу C3, C4, C5. Фрагмент комплементу C3 є центральним з точки зору ініціації класичного та альтернативного шляхів активації системи комплементу.

Гіперактивність лізуючої функції білків системи комплементу сьогодні ефективно корегується різноманітними специфічними моноклональними антитілами до фрагментів комплементів та їх рецепторів.

Наприклад, встановлена можливість використання препарату Екулізумаб (людські анти-C5 моноклональні антитіла) для лікування атипового гемолітико-уремічного синдрому [1].

Показано також що інгібітор фактору D комплементу призводить до пригнічення внутрішньосудинного гемолізу та підвищення рівню гемоглобіну у невиліковних пацієнтів з пароксизмальною нічною гемоглобінурією (ПНГ) [2].

Зміна продукції білків комплементу є важливим маркером степені вираженности патологічного процесу при аутоімунних захворюваннях печінки та селезінки. Але у повному обсязі невідомі причини активації цих білків у пацієнтів з гепатоспленомегалією.

Мета роботи: оцінка продукції білків системи комплементу (C3, C4) під впливом сироваткових цитотоксичних компонентів при гепатоспленомегалії.

Завдання роботи:

1. Визначення змін вмісту білків системи комплементу (C3, C4) в сироватці крові пацієнтів з гепатоспленомегалією.
2. Визначення гемолітичної активності білків системи комплементу (C3, C4) при гепатоспленомегалії.
3. Визначення вмісту цитотоксичних фракцій DAMPs в сироватці крові при гепатоспленомегалії.
4. Обробка та аналіз отриманих даних для встановлення статистично значущих змін у продукції білків системи комплементу та їх гемолітичної активності, пов'язаної з наявністю цитотоксичних фракцій DAMPs різної природи
5. Оцінка кореляційної взаємодії значення клінічних особливостей пацієнтів і цитотоксичності сироваткових DAMPs з характером зміни білків системи комплементу.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Система комплементу

До складу системи комплементів входить понад 30 білків, які присутні в організмі у вигляді розчинних білків у крові або як білки, асоційовані з мембраною. Комплемент вперше був ідентифікований як термолабільний принцип у сироватці крові в 1890-х роках. Активація системи комплементу призводить до послідовного каскаду ферментативних реакцій, що ми називаємо шляхами активації системи комплементу [3].

1.1.1 Шляхи активації системи комплементу.

Всього відомо три шляхи активації каскаду системи комплементу: класичний, альтернативний та лектиновий (рис. 1.1).

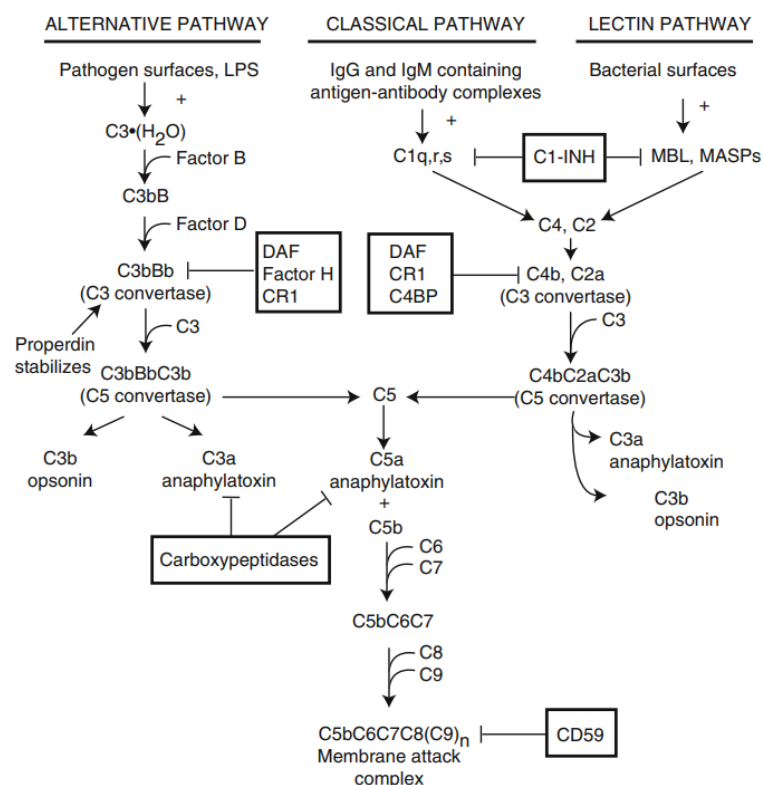


Рис. 1.1 Три різні шляхи активації комплементу: альтернативний, класичний і лектиновий шляхи; Фактори, які можуть пригнічувати шляхи, вказані в рамках [3].

Класичний шлях активації починається коли відбувається зв'язування імуноглобулінів G (IgG) та IgM з антигенами. Далі з Fc-частиною імунного комплексу зв'язується білок C1, що є мультимерним білком та складається з молекул C1q, C1r та C1s. Після цього C1s розщеплює компоненти C2 та C4, внаслідок чого утворюються молекули C4b та C2a, які зв'язуючись утворюють C3-конвертазу (C4bC2a). C3-конвертаза додатково розщеплює C3, щоб вивільнити C3a і C3b. При цьому C3b належить до опсонінів, він сприяє подальшому посиленню активації системи комплементу та фагоцитозу. Після C3b утворює комплекс з C3 конвертазами з утворенням C5 конвертаз: C3bBbC3b (класичний шлях активації) та C4bC2aC3b. Конвертази C5 розщеплюють білок C5 з утворенням C5a і C5b. Далі відбувається зв'язування білків C5b, C6, C7, C8 та різною кількістю молекул C9, внаслідок чого утворюється мембранний атакуючий комплекс (C5b-9, МАК). Комплекс МАК утворює пори, вставляючись у клітинні мембрани, що призводить до лізису клітин [3-5].

Лектиновий шлях активується внаслідок зв'язування лектину та манози з вуглеводневими фрагментами на поверхні патогенних клітин. Маноза циркулює у крові у вигляді комплексів із маннозозв'язуючим лектином (MBL-асоційованими білками), даний комплекс (MASP2) піддається аутоактивації внаслідок зв'язування з патогенами та сприяє розщепленню C4 з утворенням C4a та C4b. Останній далі прикріплюється до поверхні антигенів та зв'язується з іншим білком системи комплементу C2, який також розщеплюється під дією маннозного комплексу з утворенням C2a та C2b. Класичний та лектиновий шляхи відрізняються за рахунок комплексу, який сприяє утворенню C3-конвертази. Слід додати, що маннозний комплекс може існувати в 4 структурних конформаціях (MASP1, MASP2, MASP3 та усічений MASP2 або ж MAP19). Роль інших таких комплексів невідома, але MASP1 може розщеплювати C2, але не C4 [3-5].

Альтернативний шлях сильно відрізняється від перших двох шляхів, він використовує інші білки системи комплементу для отримання

конвертази C3. Даний шлях активується білками, ліпідами та вуглеводами, що знаходяться на поверхні патогенів. C3 при низьких концентраціях піддається гідролізу та утворює C3b, який зв'язується з патогенами, далі до нього приєднується фактор В, який піддається розщепленню під дією фактору D. В результаті утворюється C3-конвертаза (C3bBb), яка стабілізується пропердином (білком, що знаходиться в макрофагах та Т-клітинах). Після цього, процес схожий до інших шляхів системи компліментів, відбувається розщеплення білку C3, приєднання C3b до C3-конвертази, утворення C5-конвертази, яка розщеплює C5 і т.д [3-5].

1.1.2 Біологічна дія системи комплементу.

Внаслідок активації системи комплементу, не в залежності від обраного шляху активації, комплементи допомагають організму захиститись від патогенів в трьох напрямках: прямий лізис поверхні патогенів за допомогою комплексу МАК, підготовка імунної системи через утворення анафілотоксинів та опсонізація і очищення поверхонь за допомогою опсонінів, які залучаються макрофагів та нейтрофілів до фагоцитарних клітин [3, 5,6].

Утворення комплексу МАК відбувається після утворення C5-конвертази, що розщеплює C5 комплементу на C5a і C5b. Далі C5b може зв'язуватись з C6, який вже може приєднуватись до бактеріальної поверхні. Після приєднання до поверхні C7 асоціюється з C5bC6 з утворення наступного комплексу, що інтегрується в фосфоліпідний шар бактеріальної клітини. Комплекс C5b-7 (C5bC6C7) індукує вставлення C8 α і C8 β , утворюючи нестабільні пори. Новий комплекс C5b-8 зв'язує разом багато молекул C9 (до 13) внаслідок чого утворюються вже стабільні пори. Даний комплекс і називається МАК, він приймає участь у лізисі клітини за допомогою швидкого зростання йонів [Ca²⁺], з наступною втратою мітохондріальної полярності та молекул аденозинтрифосфат (АТФ) і аденозиндифосфат (АДФ) [3, 5,6].

На жаль, утворення МАК комплексу недостатньо для боротьби з деякими патогенами, бо вони розвинули додаткові механізми самозахисту. Тому система комплементів має додаткові шляхи захисту, такі як анафілатоксини. Вони здатні залучити інші компоненти імунної системи до захисту. Анафілатоксини – є потужними протизапальними молекулами, які грають роль системи тривоги для імунної системи, вони також виступають як потужні хемоаттрактанти для певних класів лейкоцитів. До анафілатоксинів належать молекули C4a, C3a та C5a. Вони зв'язуються з N-кінцевим фрагментом споріднених рецепторів на поверхні клітин імунної системи, що дозволяє змінам внутрішньоклітинного домена за допомогою G-білку передавати сигнал всередину клітини. Вони впливають на такі імунні клітини, як макрофаги, нейтрофіли, базофіли, еозинофіли та мастоцити, що призводить до різних наслідків. При цьому було показано, що комплемент C5a значно сильніший від інших анафілатоксинів у індукції реакцій імунної системи [6].

Останній напрямок впливу системи комплементів на імунну систему це утворення опсонинів C3b, які приєднуються до молекул патогенних клітин та виступають в якості молекул-маркерів для фагоцитуючих клітин (макрофагів та нейтрофілів). Розпізнавання фрагментів опсонічного комплементу та продуктів його розщеплення фактором I (iC3b, C3c, C3dg) фагоцитарними клітинами відбувається за допомогою білків родини CR(CR1-4, CR1g). Зв'язування CR1 з опсонінами призводить окрім фагоцитозу патогену, також до виділення протизапальних молекул інтерлейкінів та простагландинів, та відіграє роль у презентації антигену В-клітинам. CR2 зв'язується з продуктами протеолізу C3b та підвищує імунну відповідь В-клітин. CR3 та CR4 – трансмембранні білки, що належать до сімейства інтегринів. Вони відіграють свою роль при фагоцитозі, а також транспортуванні лейкоцитів, адгезії, міграції та костимуляції [3, 6].

Однак здатність системи комплементу брати участь у захисті не обмежується вродженою імунною діяльністю, вона також приймає участь у формуванні ефективної адаптивної імунної відповіді [3].

1.1.3 Активація білків системи комплементу належить до гуморального фактору вродженого імунітету.

Імунітет є способом захисту організму від шкідливої генетичної інформації екзогенного та ендогенного походження. Адаптивний, або ж специфічний, імунітет притаманний лише вищим хребетним тваринам. Його роль заключається в імунній відповіді на якісь конкретні антигени за допомогою Т- і В-лімфоцитів. Вроджений імунітет існує майже у всіх живих організмів, першовідкривачем вродженого імунітету вважається І.І. Мечников. Крім того, як специфічний так і вроджений імунітет поділяється на гуморальний та клітинний. Клітинний представлений перш за все за допомогою лейкоцитів, які виробляють антибактеріальні речовини та виконують фагоцитарну функцію (моноцити, нейтрофіли, а також природні кілери та дендритні клітини). До гуморального імунітету відносяться система комплементу, лізоцим і система цитокінів. Досить тривалий час вважалося, що система комплементу виконує тільки ефекторну функцію. Але згодом з'ясували, що гуморальний імунітет був знижений у мишей з тимчасовим виснаженням С3 в сироватці крові, це й стало основним моментом для розуміння, що система комплементу бере участь у розвитку гуморальної відповіді, диференціації В-клітин. Подальші дослідження показали, що на відповідь антитіл впливають білки С3 та С4 системи комплементу [3, 6].

Одним із головних шляхів участі комплементу в гуморальному імунітеті стало можливість з'єднання С3 та С4 з рецепторами CD21, CD19, CD81, що експресуються на В-клітинах. Після активації В-лімфоцити проходять різні стадії диференціювання, залежно від сигналу та наявності допомоги Т-клітин. При оптимальній стимуляції В-клітини диференціюються в ефекторні клітини та клітини пам'яті. Це відбувається

за рахунок зародкових центрів всередині В-клітин, які утворюються за допомогою Т-клітин та джерела антигену. Після В-клітини зазнають зміни ізо типу і починають виробляти IgG [3, 6].

1.1.4 Регуляція виробництва білків системи комплементу

Система комплементу може не тільки позитивно впливати на організм-хазяїн, але й призводити до руйнівних наслідків, якщо не відбувалося б регулювання системи. Наприклад, активація класичного та лектинового шляху залежить від наявності патогенних організмів, але ішемія тканин чи реперфузія можуть призводити до активації обох шляхів та негативних наслідків для організму (аутологічне ушкодження). Більш логічним є регулювання комплементу C3b, що утворюється через активацію та ампліфікацію альтернативного шляху, тож якщо його не регулювати, це може призвести до значних наслідків. Тому активація альтернативного шляху повинна проходити на патогенних мішенях. Для цього організм використовує інгібіторні білки для регулювання розташування та активності комплементу (табл. 1.1) [4, 5, 7].

Таблиця 1.1

Регуляторні білки системи комплементу в організмі людини та їх функції [7]

Регулятор	Функції	Розташування
Інгібітор C1 (INH-C1)	Інактивує кофактор C1r і C1s, MASP-1 і MASP-2	Плазма
MCP	Кофактор для опосередкованого фактором I розщеплення C3b і C4b	Мембрано зв'язаний
DAF	Дестабілізує C3/C5 конвертази класичного та альтернативного шляху	Мембрано зв'язаний
CR1	Активність прискорення розпаду, а також активність кофактора для	Мембрано зв'язаний

	опосередкованого фактором І розщеплення C3b і C4b	
C4BP	Зв'язується з C4b, прискорює розпад та активність кофактора	Плазма
Фактор Х	Зв'язується з C3b, прискорює розпад конвертаз C3 і C5 альтернативного шляху і кофакторну активність	Плазма
Тромбомодулін	Підвищує активність кофактора CFH, активує опосередковану TAFI інактивацію C3a та C5a	Мембрано зв'язаний
Фактор І	Деградує C3b та C4b за допомогою кофакторів	Плазма
CD59	Блокує асоціацію C9 з C5b-8, щоб запобігти утворенню МАК на клітинах хазяїна	Мембрано зв'язаний
S-протеїн (вітронектин)	Зв'язується з C5b-7 і пригнічує полімеризацію C9	Плазма
Кластерін (SP- 40)	Зв'язується з C5b-7 і пригнічує створення C5b-9	Плазма

Білок інгібітор C1 необоротно зв'язується та інактивує C1r, C1s і MASP, MASP2 різних шляхів активації. Дефіцит цього інгібітору призводить ангіоневротичного набряку. Також до регуляторних білків системи комплементу в організмі людини відносяться DAF – дестабілізує C3 і C5- конвертази. Фактори H та I є ключовими регуляторами у випадку альтернативного шляху активації системи. Якщо один з них відсутній або не виконує своїх функцій. Фактор I інактивує комплемент C3b до iC3b та далі до C3dg і C3c використовуючи також кофактор H. Основним джерелом фактору H є печінка, однак синтез можливий і поза печінкою в таких

клітинах як ендотеліальні. Фактор Н конкурує з CFB у зв'язуванні з C3b та знижує стабільність комплексу конвертази C3bBb прискорюючи її розклад, таким чином він може регулювати дію альтернативного шляху активації та пригнічувати його активацію [4, 5, 7].

Комплекс МАК також піддається регуляції за допомогою вітронектину (S білку) та кластерину. Вітронектин зв'язується з комплексом C5b-7 та взаємодію з C9 утворюючи SC5b-9, що призводить до пригнічення полімеризації комплексу. Кластерин діє подібним чином, але він також не дозволяє комплексу прикріпитись до клітинної мембрани патогену. Ці два інгібітори запобігають збиранню повного комплексу МАК і не дозволяють йому приєднати більшу кількість C9. Також подібні властивості має CD59, але він взагалі зупиняє утворення комплексу на останньому етапі, не дозволяє приєднувати C9 [4, 5, 7].

1.1.5 Вплив системи комплементу на інші елементи імунної системи.

Як згадувалося раніше білки системи комплементу мають три основні функції в організмі-хазяїні: утворення МАК, анафілотоксинів та опсонінів. Останні два типи білків мають основну властивість впливати на інші елементи імунної системи, тому мова піде саме про них (рис. 1.2).

Гуморальний адаптивний імунітет повинен захищати організм за допомогою ефекторних В-клітин та В-клітин пам'яті, а також вироблених В-клітинами антитіл, що призводить до нейтралізації та опсонізації патогену та забезпечує імунологічну пам'ять для швидкої відповіді при повторному зараженні. Сила цієї відповіді зумовлена складною взаємодією імунних механізмів, що залежить від антигенів і присутності хелперних Т-клітин. Ефектори комплементу задіяні в гуморальному імунітеті на багатьох етапах диференціювання В-клітин, відповідно можуть впливати на функції В-клітин на різних рівнях. Комплемент посилює В-клітинний імунітет в основному за допомогою рецепторів CR1 та CR2, що експресуються на В-лімфоцитах та фолікулах дендритних клітин (ФДК), і зв'язування з опсонінами. CR2 утворює рецепторний комплекс з сигнальним білком CD19

і білком тетраспан (CD81) для формування В-клітинного корецепторного комплексу (CD21-CD19-CD81). Даний комплекс підтримує посилений сигнал через В-клітинний рецептор, коли він зустрічає антиген, покритий опсонінами комплементу, що призводить до зниження порогу активації В-клітин на декілька порядків. Таким чином, комплемент можна розглядати як «вроджений ад'ювант» і як інструктор гуморальної імунної відповіді[4].

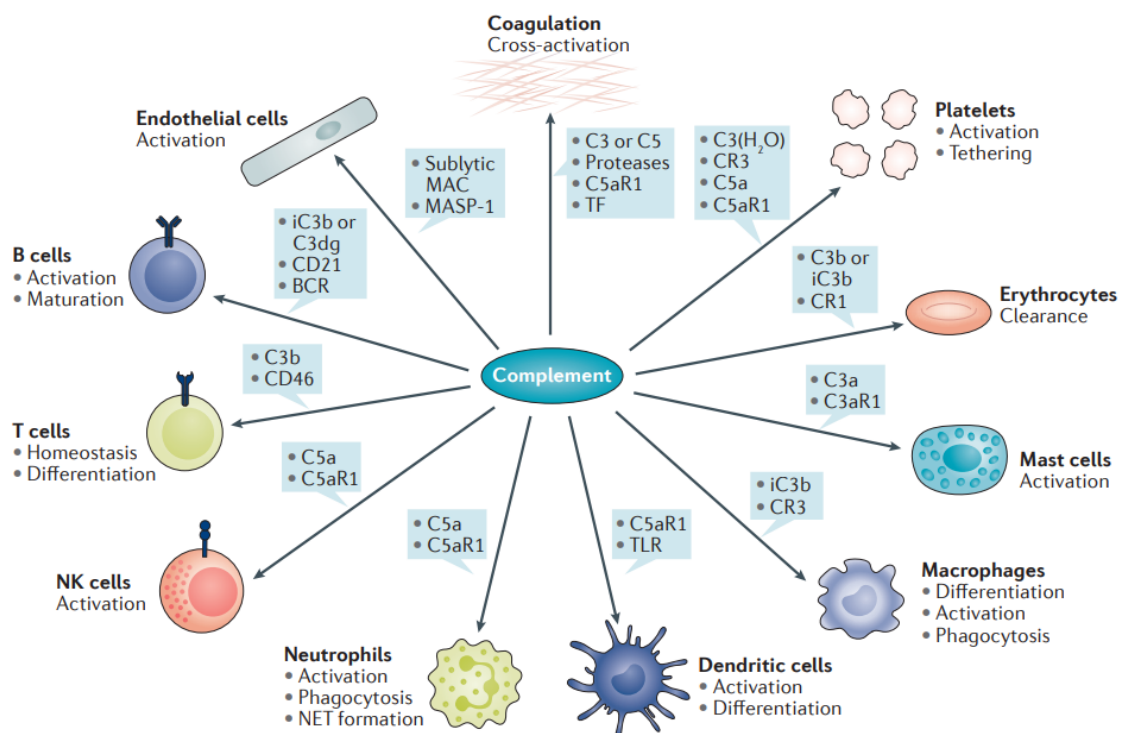


Рисунок 1.2 Приклади взаємодії комплементу з імунними клітинами та захисними шляхами. Генерація ефektorів комплементу стимулює широкий спектр наступних імунних, запальних і прокоагуляційних реакцій [9].

Визначити вплив білків комплементу на Т-клітини допомогло дослідження на моделі миші з дефіцитом DAF (CD55). Роль цього білку полягала в прискоренні розпаду С3-конвертази системи комплементу. Тобто його дефіцит призвів до посилення активації комплементу і це дозволило дослідити його вплив на Т-клітинний імунітет. Було показано, що миші з дефіцитом мали підвищений ТН1, що відповідно призводив до

високих рівнів інтерферону- γ та IL-2, але знижував рівень IL-10. Також спостерігалась посилена Т-клітинна імунна відповідь на вірусні патогени [4].

Гранулоцити, що належать до першої лінії неспецифічного протимікробного захисту підвищують свою активність при наявності C5a-фракції активованої системи комплементу [8].

1.2 Роль системи комплементу в забезпеченні детоксичної ролі печінки та елюмінаційної ролі в селезінці

Печінка є основним місцем синтезу білка, включаючи компоненти системи комплементу. Поєднання аутоімунних та запальних реакцій при багатьох захворюваннях є проблемою при наданні допомоги пацієнтам, особливо при виборі терапевтичних препаратів. Система комплементу при цьому ретельно досліджувалась для визначення її ролі при гепатобіліарних захворюваннях зараз переживає відновлення клінічного значення через можливості моніторингу опсонічної, фагоцитарної та гемолітичних функцій комплементу. Серед різних органів особливої уваги заслуговує печінка, оскільки вона виробляє компоненти комплементу і в той же час може бути жертвою місцевої активації тих самих компонентів або шляхом секвестрування еритроцитів, покритих C3b [10, 11].

Синтез білків C2, C3, C4, фактору В та інших білків системи комплементу відбувається в гепатоцитах. Комплосома достатньо новий термін, що описує причетність білків системи комплементу до місця їх виробництва, тобто всередині клітин. Система комплементу бере участь в гомеостазі просвіту кишки так як C3 може синтезуватися кишковими епітеліальними клітинами, які також у великій кількості продукують IgA. Мікробіота кишкового тракту містить чужорідний геном, в основному визначений двома домінантними філотипами Bacteroidetes і Firmicutes.. Зрілий мікробіом може викликати запалення при захворюваннях печінки та

регулює толерантність до цих бактерій. В результаті лімфоїдна тканина кишечника сканує склад мікробів, тобто портальну кров, що досягає печінки, вона буде принаймні частково оброблена шляхом імунного розпізнавання. Також було визначено що такі білки системи комплементу як C1q, C3, C5 і фактор D приймають участь в алкольному пошкодженні печінки у мишей. При цьому спостерігалася більша сприйнятливість мишей з дефіцитом C3 до індукованого ураження печінки етанолом. Інші дослідження свідчать що C5 може відігравати важливу роль у підтримці гомеостазу печінки впливаючи на контроль рівню тригліцеридів та холестерину в сироватці крові [11].

Порушення функцій печінки через участь системи комплементу може відбуватись з кількох причин. Перша з них це надмірна активація каскаду реакцій. Коли комплемент активується занадто інтенсивно, утворюються великі кількості мембраноатакуючого комплексу (MAC) та інших активних компонентів, таких як C3a і C5a, які є потужними хемотаксичними і запальними агентами. Ці молекули сприяють притоку запальних клітин до печінкової тканини, що може призвести до хронічного запалення, пошкодження гепатоцитів та розвитку фіброзу [11].

Також відповідно комплемент може атакувати заражені інфекційними агентами гепатоцити. Наприклад, деякі віруси можуть інгібувати компоненти комплементу (наприклад цитомегаловірус) , що дозволяє їм уникати імунного нагляду і спричиняти хронічні інфекції, які пошкоджують печінку. Хронічні вірусні гепатити, такі як гепатит В і С, часто призводять до активації комплементу та запальних процесів, що з часом може викликати цироз або рак печінки [12, 13].

Наступна причина це утворення аутоантитіл, що призводить до аутоімунного гепатиту. Це змушує білки комплементу атакувати власні клітини печінки [13].

Селезінка поділяється за функціями та структурою на червону пульпу і білу пульпу, між цими двома областями розташована маргінальна зона у

гризунів і перифолікулярна зона у людини. Біла пульпа є первинною імунологічною областю селезінки в обох видів, однак вона становить менше чверті тканини селезінки. Червона пульпа становить більшу частину тканини та має імунну функцію, на відміну від білої. Крім того у селезінці відсутні аферентні лімфатичні судини, тому всі клітини та антиген потрапляють у селезінку через кров [14].

Червона пульпа очищує кров від старих, мертвих або опсонізованих білками комплекменту клітин, одночасно досліджуючи їх на патогени. Неправильна дія системи комплекменту може призводити до різних захворювань пов'язаних з печінкою [14].

До цих захворювань можна віднести аутоімунну гемолітичну анемію при якій білки систем комплекменту залучені до руйнування власних еритроцитів. Даний процес відбувається коли білки комплекменту починають опсонізувати еритроцити крові, внаслідок чого селезінка приймає їх за мішені для знищення. Це призводить до анемії та спленомегалії. До подібних симптомів також призводить параксизмальна нічна гемоглобінурія під час якої еритроцити втрачають специфічні білки розпізнавання CD47 та піддаються імунній відповіді системи комплекменту та в подальшому селезінки [15].

1.3 Вплив DAMP на активацію системи комплекменту

У 1989 Janeway С.А. запропонував теорію, згідно якої наш організм має спеціальні механізми виявлення патогенів за допомогою розпізнавання збереження молекулярних патернів асоційованих з патогенами (PAMP). Зв'язування цих патернів з Toll-like рецепторами дає можливість попередити організм про небезпеку та викликати реакцію імунної системи [16]. Однак ця теорія не пояснювала, чому активність імунітету може підвищуватись і в звичайних стерильних умовах, наприклад, пошкодження

тканин або травми. Тут в силу вступає нова теорія, яку запропонував Поллі Матцінгер [17].

Дана теорія описує подібні до PAMPs молекули, але пов'язані з ураженням тканин (DAMPs), що також здатні призводити до активації імунної системи. Однак протягом певного часу це вважали лиш теорією, допоки HMGB1 та кристали сечової кислоти не були віднесені до DAMP [18, 19]. Отже, DAMPs – молекули, які виконують звичайні функції всередині клітини, але за межами клітини виконують функцію маркерів пошкодження. Також слід сказати, що утворенню DAMPs не сприяє апоптоз. Виділення цих цитотоксичних елементів може відбуватися при некрозі або навіть у живих клітин, які піддаються сильному стресу [17].

Було встановлено, що у пацієнтів з політравмою сироваткові рівні продуктів активації системи комплементу C3a та C5a були значно підвищені протягом 10 днів спостереження. Зазвичай після травми виділення DAMPs призводить до активації альтернативного шляху системи комплементу. Цікавим також є те, що виділення C5a внаслідок активації каскаду після травми призводить більше до негативних результатів, особливо якщо він виділяється у великих кількостях. Адже цей білок є потужним індуктором всіх ознак запалення, може викликати пошкодження віддалених органів та сповільнювати загоєння ран [20].

Виділення DAMPs та їх вплив на активацію системи комплементу призводить також до стягнення до місця травми нейтрофілів та макрофагів. Білки C3a та C5a можуть хемотаксично направляти фагоцити до пошкоджених клітин. Далі фагоцити розпізнають сигнали DAMP за допомогою рецепторів і перетворюють їх на клітинну відповідь [20].

Відповідно ендосимбіонтної теорії мітохондрії клітини бактерій були поглинені або захоплені клітинами архезоїдів. Таким чином можна пояснити і подібність мітохондрій до бактерій, і незалежний геном. Крім цього вивільнення мітохондріальних молекул таких як мітохондріальна ДНК може викликати прозапальну відповідь (табл. 1.2). Щоб запобігти

витоку прозапальних мітохондріальних молекул у цитозоль або позаклітинний простір у контексті мітохондріальної дисфункції, клітини розробили різні системи профілактики. Однією з таких систем є аутофагія, яка дозволяє клітинам переробляти пошкоджені мітохондрії та запобігати витоку їх вмісту в цитозоль або позаклітинний простір. Однак у контексті значного клітинного стресу та пошкодження тканини система може бути перевантажена, і мітохондріальні DAMPs вивільняються в цитоплазму або позаклітинний простір, викликаючи прозапальну відповідь [21].

Таблиця 1.2

Молекулярні структури пов'язані з пошкодження мітохондрій [21]

mtDAMPs	Позаклітинна дія	Супутні захворювання
мтДНК	Прозапальна відповідь, активація нейтрофілів і продукція NET, підвищення експресії TLR9 в макрофагах	Сепсис, травма, кардіогенний шок, рак, печінкова та серцева недостатність, атеросклероз, інсульти, ревматоїдний артрит
АТФ	Прозапальна відповідь, хемотаксис нейтрофілів, адгезія, фагоцитоз і дегрануляція	Рак, астма, захворювання легень
TFAM	Прозапальна відповідь, синергічний ефект з іншими мітохондріальними DAMPs для збільшення виробництва цитокінів у моноцитах і дендритних клітинах	Теплова недостатність, хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ)

N-форміл пептид	Прозапальна відповідь, хемоаттрактант для нейтрофілів і активує тромбоцити	Травма з синдромом системної запальної відповіді, ураження печінки
Сукцинат	Прозапальна відповідь, запускає внутрішньоклітинну мобілізацію, міграцію кальцію та має синергічний ефект з лігандами TLR для виробництва цитокінів у дендритних клітинах	Гіпертензія легеневої артерії
Кардіоліпін	Прозапальна відповідь, активує імунну опосередковану інфламмасомою відповідь, активація та проліферація певних Т-клітин	Пневмонія, ХОЗЛ
Цитохром-с	Прозапальна відповідь, клітинна токсичність, індукований апоптоз лімфоцитів і нейрональних клітин	Інфаркт міокарда, захворювання печінки, рак, гостра енцефалопатія, гемодіаліз

Точний механізм того, як мтДНК вивільняється в цитозоль і позаклітинний простір, повністю не охарактеризований. Однак окрім пасивного вивільнення мітохондріальних фракцій DAMP внаслідок некрозу або апоптозу деякі дослідження вказують на їх можливість активно секретуватися у позаклітинний простір. Внаслідок цих досліджень

з'явилися припущення, що мітохондрії також можуть виступати як імуномодулятори вродженої імунної системи та бути потенційними терапевтичними мішенями для захворювань із неконтрольованим запаленням [21].

1.4 Методи аналізу системи комплементу

Як вже згадувалося вище існує багато речовин, які можуть впливати на регуляцію активності білків системи комплементу. Клінічні та експериментальні дослідження показують важливу роль комплементу в імунодефіцитних розладах та патогенезі численних захворювань [22].

Розуміння того, що каскад білків комплементу відіграє важливу роль сприяло створенню багатьох методів дослідження для кращого визначення тяжкості захворювання, причин захворювання та відповіді на терапію. Сучасні діагностичні технології зосереджені на кількісному визначенні продуктів розщеплення комплементу або утворенню білок-білкових комплексів [22].

Дефекти системи комплементу можуть бути причиною рецидивуючої інфекції, через імунодефіцит. Наприклад, у осіб із дефіцитом C5-C9 (тобто зменшене утворення МАК) спостерігається збільшення частоти менінгококової інфекції у 1000-10000 разів. Також дефіцит пропердину (CFP, що регулює альтернативний шлях активації каскаду) призводить до збільшення частоти менінгококової інфекції з летальністю понад 25%. Для визначення дефіциту CFP можна використовувати тест АН50, але він не завжди може дати точну відповідь, тому краще використовувати пряме кількісне визначення пропердину або застосування імуноферментного аналізу. Крім того генетичний дефіцит манози може призводити до проблем з лектиновим шляхом активації і як наслідок підвищеного ризику інфікування у новонароджених [22].

Дефекти системи комплементу, особливо класичного шляху активації, можуть брати участь у аутоімунних захворюваннях таких як системний червоний вовчак. Частіше низькі титри СН50 і С4 зумовлені підвищеною активацією *in vivo*. Але у пацієнтів із вовчаковим нефритом, часто виявляються аутоантитіла до С1q, що може мати прогностичне значення [22].

Для оцінки функціональної активності системи комплементу зазвичай використовується гемолітичний аналіз. Цей метод базується на протоколах вперше описаних Mayer і Rapp. Серійні розведення зразка для аналізу інкубують із сенсibiliзованими антитілами барана при певній температурі. Гемолітичний аналіз зазвичай проводиться в пробірках з різною концентрацією досліджуваної сироватки. Результати виражаються як зворотні розведення зразка необхідні для 50% (СН50) або 100% (СН100) лізису. Тобто тест показує у скільки разів треба розвести досліджувану сироватку крові для появи помутніння при феномені лізису еритроцитів [23].

Тести, що оцінюють функціональну активність альтернативного шляху (АН50) використовують еритроцити морської свинки та інші як клітини-мішені. Для блокування класичного шляху використовуються необхідна концентрація Mg^{2+} та EGTA для хелатування Ca^{2+} [22].

Функцію комплементу також можна перевірити шляхом вимірювання концентрації продуктів активації такими як IgM, лектин та манноза за допомогою імуноферментного аналізу ELISA [24].

Найзручніший шлях вимірювання активності окремих компонентів комплементу це перевірка здатності зразків відновлювати гемолітичну активність дефіцитної за білком сироватки. Для цього використовують свіжу сироватку яка зберігалась при температурі $-70^{\circ}C$ до тестування. Та перевіряють її здатність відновити гемолітичну активність при додаванні відповідних очищених функціонально активних компонентів [24].

Рівень індивідуальних компонентів комплементу, незважаючи на їх функціональну активність, можна виміряти за допомогою тестів імунопреципітації (що використовується в даній роботі), ELISA або Вестерн-блот. Зазвичай проводять вимірювання концентрації білків С3 і С4 при аналізі системи комплементу. Дані методи визначення окремих компонентів є сенс використовувати коли спостерігається зменшення гемолітичної активності [25].

Слід сказати, що вимірювання гемолітичної активності та окремих компонентів використовуються як первинні методи скринінгу. Існують також методи аналізу продуктів активації комплементу в ході яких використовують моноклональні високоспецифічні антитіла, які розпізнають неоепітопи лише під діє конформаційних змін, спричинених активацією. Продукти активації комплементу зазвичай присутні в невеликих кількостях *in vivo*, але починають швидко утворюватись *in vitro*, тому важливим є правильне зберігання зразків. Кров слід набирати безпосередньо у пробірки з ЕДТА (концентрація після додавання принаймні 10 мМ). Крім того в якості антикоагулянту краще використовувати нафамостат мезилат, бо гепарин не здатен достатньо блокувати активацію комплементу, а зберігати зразки краще при -70°C . Але при цьому також слід враховувати період розпаду білків, таким чином С5а здатен існувати близько хвилини тому виявити його складно, білки комплексу МАК живуть близько години, а компонент С3 близько 2 годин [22].

1.5 Гепатоспленомегалія

Гепатоспленомегалія – синдром, що характеризується одночасним збільшенням селезінки та печінки. Діагностика зазвичай проводиться методом пальпації або за допомогою КТ чи ультразвукового дослідження [26]. Основними причинами виникнення є порушення обміну речовин, інфекційні, гематологічні або аутоімунні захворювання. Збільшення

печінки є цінним маркером для розуміння захворювання і використовується на практиці в поєднанні з іншими симптомами пацієнта та лабораторними тестами. Наприклад, таким чином розрізняють холестааз, портальну гіпертензію та гепатоцелюлярну недостатність, кожне захворювання має чітко визначені ознаки, на які може натякати якраз гепатомегалія [26-27].

Гепатит В (HBV) є людським прототипом вірусів *Hepadnaviridae*. Генوم вірусу складає кільцева, частково дволанцюгова, молекула ДНК. Основним діагностичним маркером цього захворювання виступає білок оболонки HBsAg. Цей антиген також може слугувати імунорегуляторним білком. Взагалі вірус гепатиту В не є цитопатичним для гепатоцитів, але інфіковані клітини печінки викликають клітинну імунну відповідь на вірус. Цитотоксичні Т-лімфоцити та Т-клітини хелпери надсилають цитокіни, що здатні пригнічувати реплікацію вірусу, призводять до деградації його РНК. Крім того, інфіковані гепатоцити піддаються апоптозу через зв'язування цитотоксичних Т-клітин з лігандом Fas [28].

Вірус гепатиту С належить до сімейства вірусів *Flaviviridae*. Їх генوم представлений позитивною одноланцюговою РНК. Виявлення зараження гепатитом С визначається також через наявність антитіл до цього вірусу у сироватці крові. Однак тест на антитіла не дає можливості точно з'ясувати проблему. Адже утворення антитіл сповільнене у 30% з появою симптомів, також антитіла які визначаються можуть бути присутні в умовах хронічної інфекції. Більш точним методом діагностики є виявлення РНК вірусу. Реакція антитіл обмежена в основному IgG. Тому дослідження свідчать, що природний вірус не викликає імунної відповіді, а також можливе повторне зараження ним [28-29].

Вірус Епштейна-Барра – це дволанцюговий ДНК-вірус, що належить до герповірусів і є основною причиною інфекційного мононуклеозу. Крім цього вірус може викликати багато інших захворювань до симптомів яких належить гепатоспленомегалія. Спленомегалія може бути непомітною під час фізичного огляду, але спостерігається при ультразвуковому

дослідження. Зазвичай збільшення селезінки спостерігається на 4-10 день захворювання, а нормалізація розмірів відбувається через 2-3 тижні, після стабілізації розмірів печінки. Печінка максимально збільшується також на 4-10 день захворювання, при цьому гепатомегалія також може супроводжуватись незначним порушенням функції печінки та помірною жовтяницею [30].

Цитомегаловірус людини є повсюдним патогеном, що мають приблизно 40-100% протестованих груп. У імунокомпетентних осіб інфекція часто протікає безсимптомно або поєднується з легкими грипоподібними симптомами. Можливе також вроджене захворювання цитомегаловірусом, що набуває під час внутрішньоутробного розвитку. Це може призводити вже до значних наслідків. Вже при народженні можуть проявитись перші симптоми, але в будь-якому випадку це несе загрозу подальшого розвитку наслідків. Загальними ознаками є гепатоспленомегалія, які легко ідентифікуються за допомогою МРТ чи УЗД плоду [31].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження динаміки зміни продукції білків системи комплементу та її гемолітичної активності відкриває широкі можливості для розуміння важливих механізмів взаємодії організму із зовнішніми впливами. У цьому контексті, вивчення відповіді системи комплементу на цитотоксичні компоненти сироватки крові виявляється особливо актуальним.

Методи досліджень, використані в роботі спрямовані на вимірювання вмісту білків системи комплементу (C3, C4) в сироватці крові та їхньої гемолітичної активності під впливом цитотоксичних компонентів (DAMP) сироватки крові.

У цьому розділі докладно описані використані матеріали та методи, що виконувались на базі державної установи "Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України". Цей розділ виступає фундаментальною складовою роботи, де кожен метод і кожна процедура мають велике значення для розуміння складних процесів, які відбуваються в системі комплементу під впливом цитотоксичних факторів.

2.1 Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження були зразки сироватки крові пацієнтів з абдомінальною патологією (гепатоспленомегалією) на тлі герпетичої інфекції (вірус Ебштейна-Бар VEB, цитомегаловірус CMV). Група складалась з 21 особи. В якості контрольної групи було взято референтний рівень (визначений в лабораторії).

Всі зразки були надані діагностичною лабораторією з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом ДУ "Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМН України".

2.2 Предмет дослідження

Предметом дослідження були вміст білків системи комплементу (С3, С4), концентрація фракцій DAMP, гемолітична активність зразків сироватки крові та їх спектральна характеристика.

2.3 Визначення гемолітичної активності комплементу

Принцип методу:

Визначення використання комплементу в реакції оснований на феномені лізису еритроцитів в присутності гомологічних антитіл та комплементу

Реагенти:

Фізіологічний розчин (NaCl 0,9%), гемолітична сироватка (ліофілізована в ампулі), відмиті еритроцити барана та розчин HCl (0,1 н).

Обладнання:

Центрифуга ОПН-3 (рис. 2.1), дозатори автоматичні



Рис. 2.1 Центрифуга ОПН-3

Приготування гемолітичної системи:

Для приготування гемолітичної системи беремо 10 мл розчиненої гемолітичної сироватки, 9,7 мл хлориду натрію (0,9%), 0,3 мл відмитих еритроцитів барана та змішати все.

Хід методу:

Спочатку в дослідні пробірки відбираємо по 0,1 мл досліджуваної сироватки. Після цього вносимо по 0,4 мл фізіологічного розчину в контрольну та дослідні пробірки. Відносимо в термостат та інкубуємо 30-60 хвилин при 37°C. Далі дістаємо пробірки, ресуспендуємо їх вміст та відбираємо по 0,1 мл з дослідних пробірок. Потім вносимо до залишку (0,4 мл) в дослідні та контрольну пробірки по 2,8 мл гемолітичної системи та знову ставимо в термостат на 15 хвилин при 37°C. Далі центрифугуємо протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. Відбираємо в сухі центрифужні пробірки по 2-3 мл надосадової рідини та додаємо по 0,5 мл розчину HCl (0,1 н).

2.4 Визначення концентрації C3 та C4 компонентів комплементу

Концентрацію компонентів комплементу визначали імунотурбідиметрично при довжині хвилі (λ) = 340 нм на біохімічному аналізаторі Stat Fax 1904, за допомогою наборів Dialab, Австрія (рис. 2.2).



Рис. 2.2 Використовуване для методу обладнання: 1 – біохімічний аналізатор StatFax 1904; 2 – набір Dialab, Австрія; 3 – дозатор автоматичний

При взаємодії білка зі специфічними антитілами відбувалося утворення імунокомплексів, преципітація яких призводила до збільшення каламутності розчину при $\lambda = 340$ нм, що було пропорційно концентрації компонентів комплементу C3 та C4 у зразку, яку виражали кількісно в мг/дл.

2.4.1 Визначення C3 компонента комплементу.

Реагенти:

Реагент антитіл комплементу C3 – турбідиметричне гранулометричне антитіло, вирощене в козі, моноспецифічне до C3 та азид натрію (0,095%).

Буфер PEG4 – фосфатний буферизований сольовий розчин PEG (4%) та азид натрію (0,095%)

Обладнання:

STATFAX 1904, $\lambda=340$ нм.

Додаткове обладнання:

Центрифуга ОПН-3 та дозатори автоматичні

Послідовність проведення:

В пробірки додаємо по 900 мкл буферу PEG4. Далі додаємо по 5 мкл зразків сироватки крові у дослідні пробірки та 5 мкл PEG4 у контрольну пробірку, струшуємо пробірки. Ставимо зразки в біохімічний аналізатор STATFAX 1904 при температурі 37°C на 5 хвилин. Виставляємо налаштування для аналізатору (оптичний шлях 1 см, довжина хвилі 340 нм, чутливість 20 мг/дл, діапазон вимірювання приблизно 0-400 мг/дл). Далі отримуємо поглинання (A1) зразків при $\lambda = 340$ нм. Додаємо по 80 мкл реагенту антитіл у зразки та знову інкубуємо 5 хвилин для максимального утворення імунокомплексів. Отримуємо поглинання (A2) зразків при $\lambda = 340$ нм після утворення комплексів. Розраховуємо різницю поглинання за формулою:

$$\Delta A = A_2 - A_1,$$

де A_2 – поглинання при $\lambda = 340$ нм після додавання реагенту антитіл та утворення імунокомплексів;

A_1 – поглинання при $\lambda = 340$ нм до додавання реагенту антитіл.

Після цього визначаємо концентрацію С3 фрагменту комплементу за калібрувальною кривою.

2.4.2 Визначення С4 компонента комплементу.

Реагенти:

Реагент антитіл комплементу С4 – турбідиметричне гранулометричне антитіло, вирощене в козі, моноспецифічне до С3 та азид натрію (0,095%).

Буфер PEG4 – фосфатний буферизований сольовий розчин PEG (4%) та азид натрію (0,095%)

Обладнання:

STATFAX 1904, $\lambda=340$ нм.

Додаткове обладнання:

Центрифуга ОПН-3 та дозатори автоматичні

Послідовність проведення:

В пробірки додаємо по 900 мкл буферу PEG4. Далі додаємо по 20 мкл зразків сироватки крові у дослідні пробірки та 20 мкл PEG4 у контрольну пробірку, струшуємо пробірки. Ставимо зразки в біохімічний аналізатор STATFAX 1904 при температурі 37°C на 5 хвилин. Виставляємо налаштування для аналізатору (оптичний шлях 1 см, довжина хвилі 340 нм, чутливість 20 мг/дл, діапазон вимірювання приблизно 0-400 мг/дл). Далі отримуємо поглинання (A_1) зразків при $\lambda = 340$ нм (рис. 2.3). Додаємо по 70 мкл реагенту антитіл у зразки та знову інкубуємо 5 хвилин для максимального утворення імунокомплексів. Отримуємо поглинання (A_2) зразків при $\lambda = 340$ нм після утворення комплексів. Розраховуємо різницю поглинання за формулою. Після цього визначаємо концентрацію С4 фрагменту комплементу за калібрувальною кривою.



Рис. 2.3 Процес отримання значень поглинання на біохімічному аналізаторі StatFax 1904

2.5 Спектральний аналіз сироватки

Вивчення спектрів сироватки крові проводили методом УФ-спектроскопії в УФ області спектра. Зразки сироватки крові пацієнтів (100 мкл) розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:20. Спектр поглинання вимірювався в діапазоні 200-400 нм, на приладі Shimadzu UV-2600 (рис. 2.4), крок сканування 0,5 нм, ширина спектральної щілини приладу 1 нм. Кювета для вимірюваних зразків 10 мм.



Рис. 2.4 Спектрофотометр Shimadzu UV-2600. Джерело: <https://zaf.th-deg.de/public/machine/78>

2.6 Статистична обробка результатів

Результати експерименту обробляли в програмі MS Excel. Розраховували середні значення досліджуваних показників, стандартне відхилення та похибку середнього. Достовірність отриманих даних оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Для з'ясування зв'язку між досліджуваними показниками визначали коефіцієнт кореляції Пірсона. Відмінності між контролем та референтним рівнем прийняті на рівні значущості $P < 0.05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Оцінка гемолітичної активності білків системи комплементу

При дослідженні аутоімунних патологій печінки та селезінки, особливу увагу було приділено гемолітичній активності білків системи комплементу. При цьому були отримані такі результати (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Гемолітична активність білків системи комплементу у сироватці крові пацієнтів з гепатоспленомегалією на тлі герпетичної інфекції та референтні значення

Групи	Гемолітична активність комплементу, гем. од.
Референтні значення	28,5±3,4
Аутоімунна гепатоспленомегалія	19,3±3,7↓↓

Аналіз результатів вимірювання гемолітичної активності білків системи комплементу показав значне зменшення гемолітичної активності у пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією в порівнянні з референтними значенням лабораторії (рис. 3.1). Спостерігається зменшення активності на 32%.

Система комплементу відіграє ключову роль у імунно-відповіді організму, включаючи захист від інфекцій, запалення та регулювання імунного відповіді. Гемолітична активність білків цієї системи забезпечує руйнування мікроорганізмів та інших потенційно шкідливих агентів. Тому

її зниження може вказувати на порушення в протизапальній та імунній системі організму.

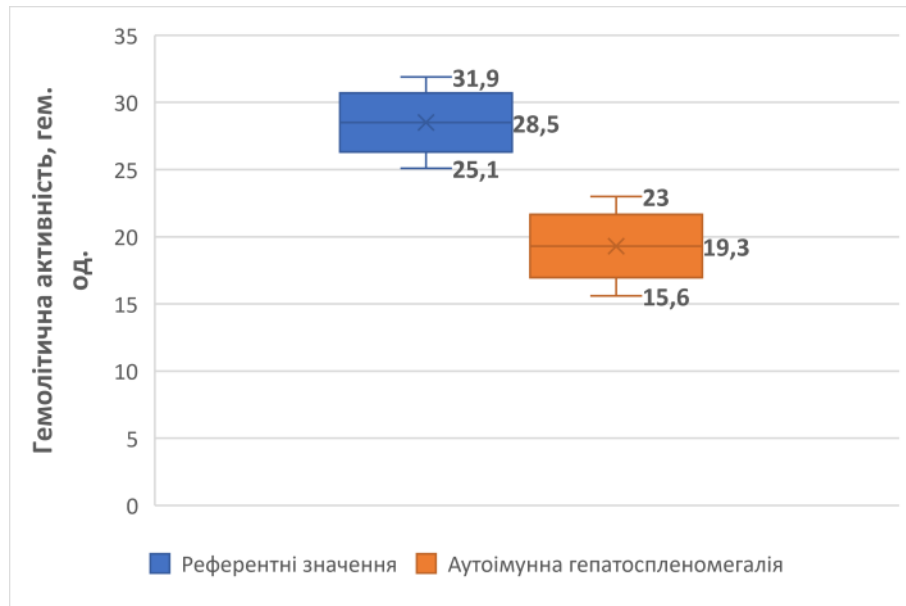


Рис. 3.1 Порівняння рівнів гемолітичної активності сироватки крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією. Дані представлені у вигляді діаграми розмахів, де маркер 'x' позначає середнє значення, а горизонтальні лінії охоплюють діапазон довірчого інтервалу.

Отримані результати підтверджують, що аутоімунні патології печінки та селезінки супроводжуються порушенням функції системи комплементу, що може бути важливим чинником у розвитку та прогресії захворювання. Детальне розуміння цього процесу може сприяти розробці більш ефективних методів діагностики та лікування таких станів, спрямованих на відновлення імунного гомеостазу пацієнта.

3.2 Оцінка вмісту фрагментів комплементу C3 та C4 в сироватці крові

Під час нашого дослідження ми спостерегли цікаві зміни в рівнях комплементу, які свідчать про складні компенсаторні механізми у відповідь на патологічні процеси. Були отримані такі результати (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вміст білків системи комплементу у пацієнтів з гепатоспленомегалією на тлі герпетичної інфекції та контрольної групи (референтні значення)

Групи	C3-компонент комплементу, мг/дл	C4-компонент комплементу, мг/дл
Референтні значення	105,0±7,1	25,0±1,12
Аутоімунна гепатоспленомегалія	153,0±6,3↑↑	19,9±4,07↓

Білок C3 є конвертазою і приймає участь у активації комплементу за класичним та альтернативним шляхом. Аналіз результатів дослідження (рис. 3.2) показує значне підвищення вмісту C3-компоненту системи комплементу в сироватці крові на 46%.

Це підвищення може свідчити про активну роль імунної системи в забезпеченні захисту організму від потенційно шкідливих агентів. Збільшена активація C3 фрагменту може бути спрямована на підтримку імунної відповіді та боротьбу з патогенами.

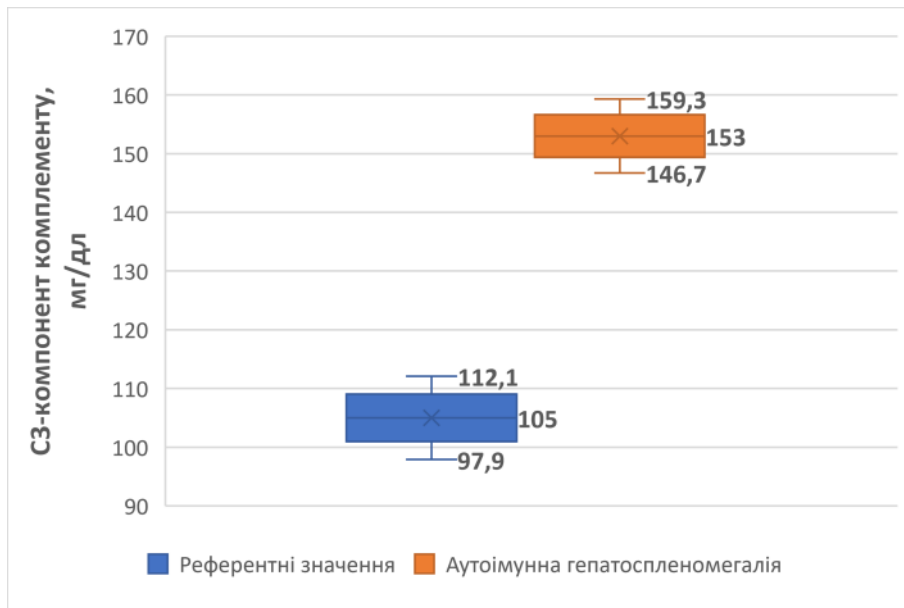


Рис. 3.2 Порівняння рівнів вмісту С3 білку системи комплементу у сироватках крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією. Дані представлені у вигляді діаграми розмахів, де маркер 'x' позначає середнє значення, а горизонтальні лінії охоплюють діапазон довірчого інтервалу.

Однак, наші дослідження також показали зниження рівня С4 фрагменту комплементу на 20% (рис. 3.3).

Це зниження, ймовірно, пов'язане з використанням С4 при утворенні мембраноатакуючого комплексу (МАК). Мембраноатакуючий комплекс грає важливу роль у лізисі бактерій та інших шкідливих клітин, і зниження рівня С4 може впливати на ефективність цього процесу.

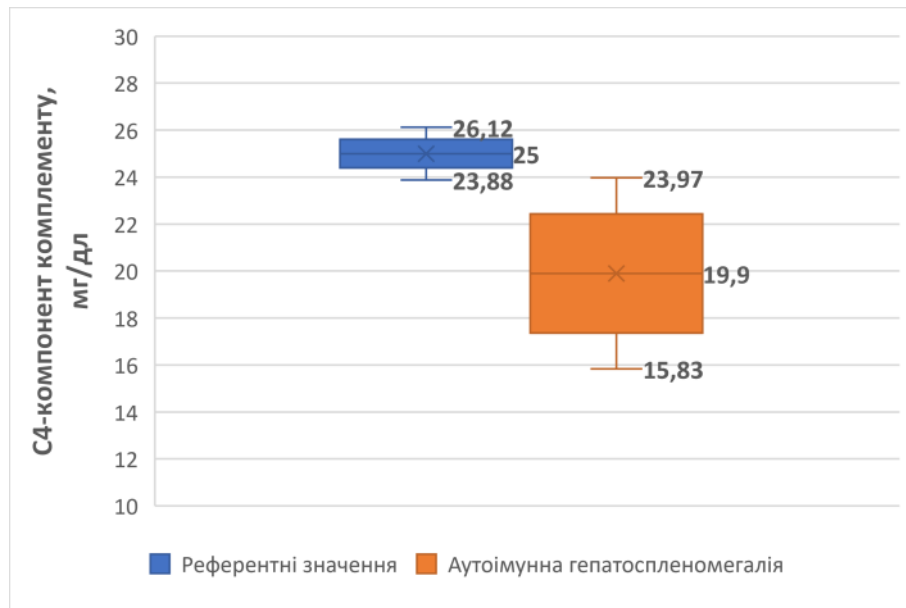


Рис. 3.3 Порівняння рівнів вмісту С4 білку системи комплементу у сироватках крові між контрольною групою (референтні значення) та групою пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією. Дані представлені у вигляді діаграми розмахів, де маркер 'x' позначає середнє значення, а горизонтальні лінії охоплюють діапазон довірчого інтервалу.

Отже, знання про ці зміни у рівнях комплементу дозволить нам краще розуміти імунну відповідь в умовах патології, а також сприятиме розробці цільованих стратегій лікування для підтримки та відновлення нормального функціонування імунної системи у пацієнтів.

3.3 Оцінка спектральних характеристик в сироватці крові цитотоксичних фракцій DAMP (олігопептидна $\lambda = 238$, олігонуклеотидна $\lambda = 260$)

Результати дослідження розкрили цікаві відмінності у спектральних характеристиках цитотоксичних компонентів сироватки DAMP (DAMP-асоційованих молекул патогенезу) у пацієнтів з гепатоспленомегалією (рис. 3.4) порівняно зі спектром сироватки здорових донорів (рис. 3.5).

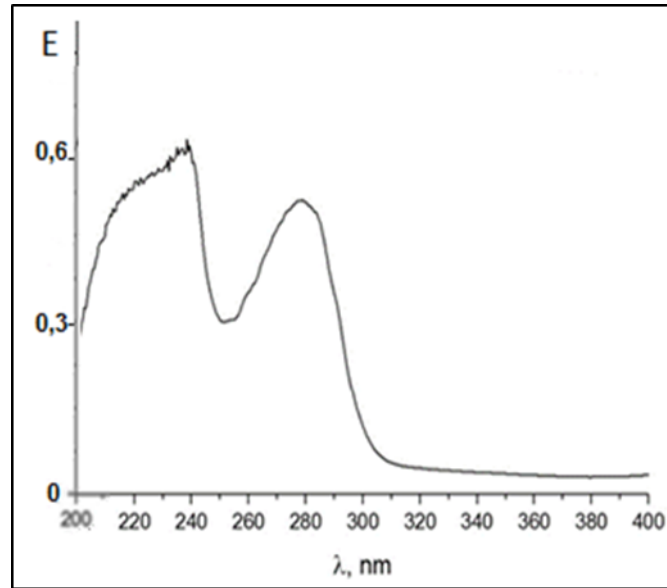


Рис. 3.4 Характерні спектральні криві: спектральна характеристика сироватки з низьким рівнем олігопептидної (DAMP238) та олігонуклеотидної (DAMP260) фракцій (група пацієнтів з аутоімунною гепатоспленомегалією)

Одна з основних відмінностей полягає в збільшенні олігонуклеотидної фракції, особливо мітохондріального походження.

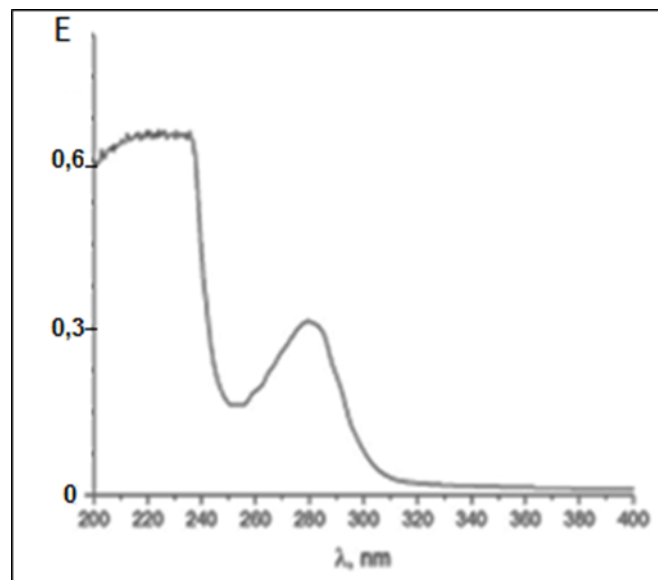


Рис. 3.5 Характерні спектральні криві: сироватка крові донора, яка містила фракції DAMP на референтному рівні.

Мітохондрії відіграють критичну роль у клітинному метаболізмі та виробленні енергії. Зміни в спектрі сироватки, вказані на підвищення олігонуклеотидної фракції мітохондріального походження, можуть свідчити про дисфункцію мітохондрій та потенційні пошкодження клітин.

Ці результати підкреслюють важливість розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі гепатоспленомегалії, та виявляють нові маркери, які можуть використовуватися для діагностики та моніторингу цього захворювання. Додаткові дослідження в цьому напрямку можуть відкрити нові можливості для розробки цільованих стратегій лікування та підтримки пацієнтів з гепатоспленомегалією.

3.4 Оцінка кореляційної взаємодії змін концентрації комплементу C3 і C4, а також гемолітичної активності сироватки крові з особливостями спектральних характеристик фракцій DAMP

Результати дослідження коефіцієнту кореляції Пірсона між різними показниками дозволили зробити певні висновки стосовно залежності характеристик сироватки крові у пацієнтів з гепатоспленомегалією на тлі герпетичної інфекції.

При дослідженні кореляції між концентраціями комплементу C3 та концентрації DAMP260 (олігонуклеотидної фракції) було отримано коефіцієнт кореляції Пірсона $R = 0,15$, що свідчить про відсутність статистично значущої кореляції між цими характеристиками (рис. 3.6).

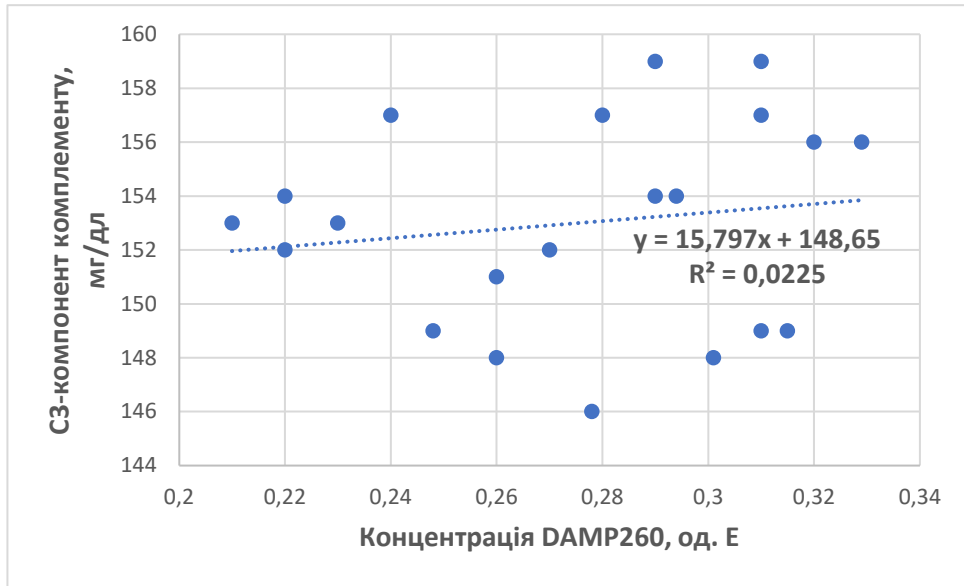


Рис. 3.6 Графік демонструє лінійну залежність концентрації С3-компоненту системи комплементу від концентрації DAMP260

При дослідженні кореляції між концентраціями комплементу С4 та концентрації DAMP260 (олігонуклеотидної фракції) було отримано коефіцієнт кореляції Пірсона $R = -0,15$, що також свідчить про відсутність статистично значущої кореляції між цими характеристиками (рис. 3.7).

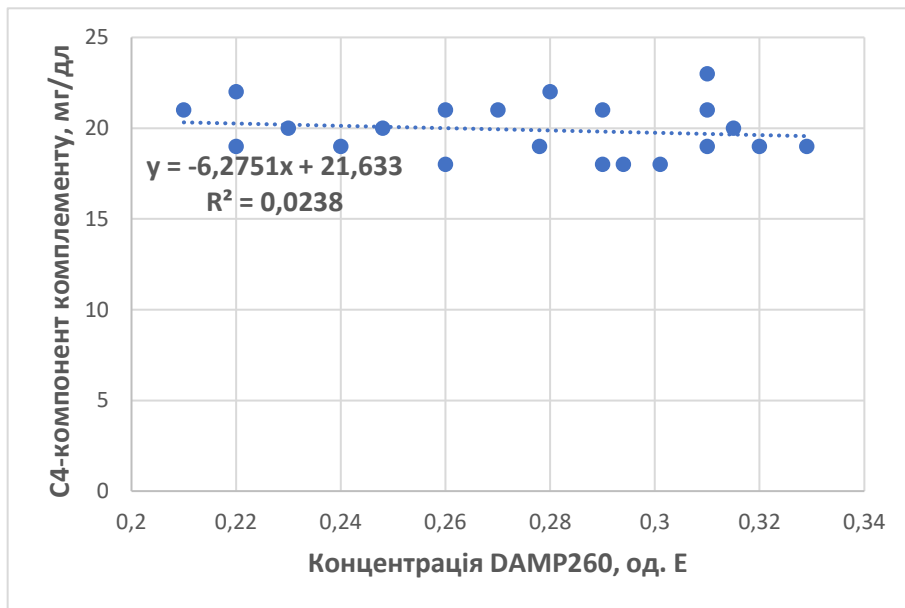


Рис. 3.7 Графік демонструє лінійну залежність концентрації С4-компоненту системи комплементу від концентрації DAMP260

При дослідженні кореляції між гемолітичною активністю зразків сироватки крові та концентрації DAMP260 (олігонуклеотидної фракції) було отримано коефіцієнт кореляції Пірсона $R = 0,12$, що також свідчить про відсутність статистично значущої кореляції між цими характеристиками (рис. 3.8)

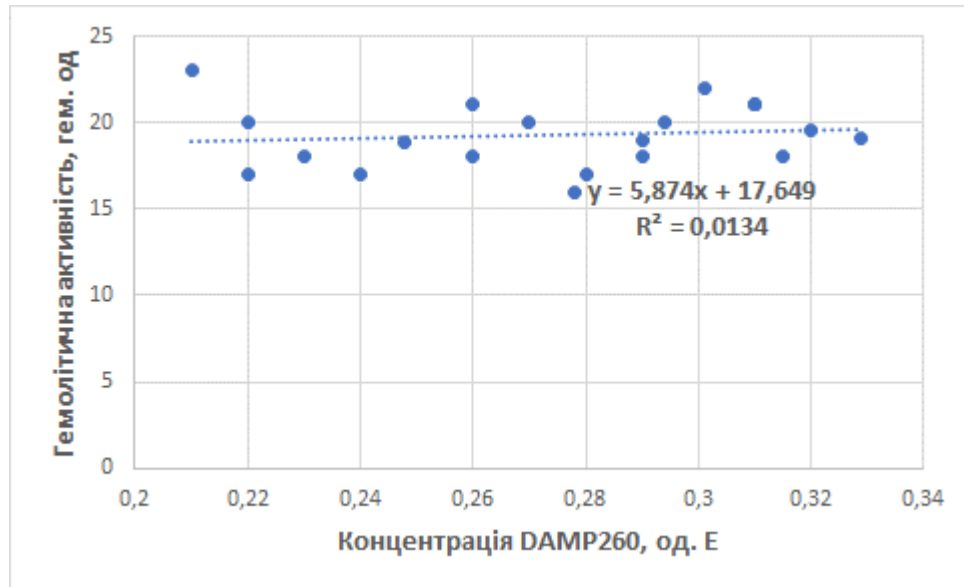


Рис. 3.8 Графік демонструє лінійну залежність гемолітичної активності зразків сироватки крові від концентрації DAMP260

ВИСНОВКИ

Дослідження динаміки зміни продукції білків системи комплементу та її гемолітичної активності відкриває важливі можливості для розуміння складних механізмів, що лежать в основі імунної відповіді організму на зовнішні впливи. У цьому контексті, дослідження відповіді системи комплементу на цитотоксичні компоненти сироватки крові є особливо актуальним, оскільки це може мати значення для розуміння патологічних процесів та розробки нових методів лікування.

В результаті цієї роботи було виконано всі поставлені завдання та отримано такі результати:

1. При аутоімунній патології печінки та селезінки виявили достовірне пониження гемолітичної активності білків системи комплементу
2. Виявили компенсаторне підвищення C3 фрагменту комплементу (конвертази, що приймає участь в активації комплементу за класичним та альтернативним шляхом)
3. Виявили зниження C4 фрагменту комплементу за рахунок його використання при утворенні мембрано атакуючого комплексу (МАК)
4. Спектральна характеристика цитотоксичних компонентів сироватки DAMP у пацієнтів з гепатоспленомегалією відрізняється від спектру сироватки здорових донорів, включаючи збільшення олігонуклеотидної фракції (мітохондріального походження)
5. Не виявили значущого кореляційного зв'язку між зміною вмісту та гемолітичної активності компонентів комплементу і різницею поглинання у спектрі при $\lambda = 260$ нм (область поглинання нуклеотидної фракції). Однак допускається, що для отримання взаємозв'язку слід дослідити окремі компоненти DAMP, а не всю фракцію.

ЛІТЕРАТУРНІ ДЖЕРЕЛА

1. Greenbaum L. A., Fila, M., Ardissino, G. et al. Eculizumab is a safe and effective treatment in pediatric patients with atypical hemolytic uremic syndrome //Kidney international. – 2016. – Т. 89. – №. 3. – С. 701-711. (дата звернення: 01.05.2024)
2. Risitano A. M., Kulasekararaj, A. G., Lee, J. W. et al. Danicopan: an oral complement factor D inhibitor for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria //Haematologica. – 2021. – Т. 106. – №. 12. – С. 3188. (дата звернення: 01.05.2024)
3. Sarma J. V., Ward P. A. The complement system //Cell and tissue research. – 2011. – Т. 343. – №. 1. – С. 227-235. (дата звернення: 01.05.2024)
4. Dunkelberger J. R., Song W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses //Cell research. – 2010. – Т. 20. – №. 1. – С. 34-50. (дата звернення: 01.05.2024)
5. Morgan B. P. The complement system: an overview //Complement methods and protocols. – 2000. – С. 1-13. (дата звернення: 01.05.2024)
6. Мінухін В. В. Імунна система організму. Імунна відповідь. Реакції імунітету. – Нова Книга, 2011. (дата звернення: 05.05.2024)
7. Noris M., Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation //Seminars in nephrology. – WB Saunders, 2013. – Т. 33. – №. 6. – С. 479-492. (дата звернення: 05.05.2024)
8. Іонов І. А. та ін. СУЧАСНА ІМУНОЛОГІЯ. - 2017. (дата звернення: 05.05.2024)
9. Ricklin D., Reis E. S., Lambris J. D. Complement in disease: a defence system turning offensive //Nature Reviews Nephrology. – 2016. – Т. 12. – №. 7. – С. 383-401. (дата звернення: 08.05.2024)
10. Fujiyoshi M., Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases //Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences. – 2011. – Т. 18. – С. 13-22. (дата звернення: 08.05.2024)
11. Lung T., Sakem, B., Risch, L. et al. The complement system in liver diseases: Evidence-based approach and therapeutic options //Journal of translational autoimmunity. – 2019. – Т. 2. – С. 100017. (дата звернення: 08.05.2024)

12. Vignesh P., Rawat, A., Sharma, M. et al. Complement in autoimmune diseases //Clinica Chimica Acta. – 2017. – Т. 465. – С. 123-130. (дата звернення: 08.05.2024)
13. Merle N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L. et al. Complement system part II: role in immunity //Frontiers in immunology. – 2015. – Т. 6. – С. 136998. (дата звернення: 08.05.2024)
14. Lewis, Steven M.; Williams, Adam; Eisenbarth, Stephanie C. (2019). Structure and function of the immune system in the spleen. Science Immunology, 4(33), eaau6085 doi:10.1126/sciimmunol.aau6085 (дата звернення: 08.05.2024)
15. Carroll M. V., Sim R. B. Complement in health and disease //Advanced drug delivery reviews. – 2011. – Т. 63. – №. 12. – С. 965-975. (дата звернення: 08.05.2024)
16. Janeway C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology //Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – Т. 54. – С. 1-13. (дата звернення: 13.05.2024)
17. Vénéreau E., Ceriotti C., Bianchi M. E. DAMPs from cell death to new life //Frontiers in immunology. – 2015. – Т. 6. – С. 159317. (дата звернення: 13.05.2024)
18. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation //Nature. – 2002. – Т. 418. – №. 6894. – С. 191-195. (дата звернення: 13.05.2024)
19. Shi Y., Evans J. E., Rock K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells //Nature. – 2003. – Т. 425. – №. 6957. – С. 516-521. (дата звернення: 13.05.2024)
20. Huber-Lang M., Kovtun A., Ignatius A. The role of complement in trauma and fracture healing //Seminars in immunology. – Academic Press, 2013. – Т. 25. – №. 1. – С. 73-78. (дата звернення: 13.05.2024)
21. Grazioli S., Pugin J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: from inflammatory signaling to human diseases //Frontiers in immunology. – 2018. – Т. 9. – С. 342896. (дата звернення: 13.05.2024)
22. Kirschfink, Michael, and Tom E. Mollnes. "Modern complement analysis." Clinical and Vaccine Immunology 10.6 (2003): 982-989. (дата звернення: 17.05.2024)

23. Mollnes, Tom Eirik, et al. "Complement analysis in the 21st century." *Molecular immunology* 44.16 (2007): 3838-3849. (дата звернення: 17.05.2024)
24. Sjöholm, A. G., et al. "Complement deficiency and disease: an update." *Molecular immunology* 43.1-2 (2006): 78-85. (дата звернення: 17.05.2024)
25. Ling, Morris, and Mandakolathur Murali. "Analysis of the complement system in the clinical immunology laboratory." *Clinics in laboratory medicine* 39.4 (2019): 579-590. (дата звернення: 17.05.2024)
26. Baker, Alastair. "Hepatosplenomegaly." *Paediatrics and Child Health* 27.5 (2017): 247-249. (дата звернення: 20.05.2024)
27. Klimova E. M., Drozdova, L. A., Lavinska, O. V. et al. Hepatosplenomegaly in liver cirrhosis is caused by reactive oxygen species formation, an increase in apoptosis and autophagy, and pronounced autoimmune reactions //Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2021. – Т. 12. – №. 3. – С. 408-418. (дата звернення: 20.05.2024)
28. Geller, Stephen A. "Hepatitis B and hepatitis C." *Clinics in Liver Disease* 6.2 (2002): 317-334. (дата звернення: 20.05.2024)
29. Ozaras, Resat, and Veysel Tahan. "Acute hepatitis C: prevention and treatment." *Expert review of anti-infective therapy* 7.3 (2009): 351-361. (дата звернення: 23.05.2024)
30. Fugl, Anders, and Christen Lykkegaard Andersen. "Epstein-Barr virus and its association with disease-a review of relevance to general practice." *BMC family practice* 20 (2019): 1-8. (дата звернення: 23.05.2024)
31. Diogo, Mariana C., et al. "The MRI spectrum of congenital cytomegalovirus infection." *Prenatal Diagnosis* 40.1 (2020): 110-124. (дата звернення: 23.05.2024)