

# РАЗРАБОТКА МЕТОДА СЕЛЕКТИВНОЙ ОЦЕНКИ МИКРОБИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕМЕНТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

**С.В. Легковой**

аспирант,  
Санкт-Петербургский государственный университет  
E-mail: stanislav.legkovoy@gmail.com

**Е.С. Умнякова**

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург)  
E-mail: umnyakova.es@iemspb.ru

**М.Н. Берлов**

к.б.н., ст. науч. сотрудник,  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург)  
E-mail: berlov.mn@iemspb.ru

**Актуальность.** Способность сыворотки крови ингибировать жизнедеятельность микроорганизмов в первую очередь обусловлена присутствием в ней группы катионных факторов (лизоцим,  $\beta$ -лизин и др.) и белков системы комплемента. Напрямую комплемент способен вызывать лизис только некоторых грамотрицательных бактерий, в то время как катионные факторы преимущественно активны в отношении грамположительных бактерий. Изучение вклада индивидуальных антимикробных компонентов сыворотки и их сочетанного действия в её микробицидность поможет расширить понимание молекулярных механизмов врожденного иммунитета.

**Цель исследования.** Разработка метода селективного истощения сыворотки по катионным факторам с сохранением функциональной активности системы комплемента.

**Материал и методы.** В качестве исходного материала использовали пулированную сыворотку крови здоровых доноров. Истощение сыворотки осуществляли в процессе ее инкубации с суспензией карбоксиметилцеллюлозы. Для поиска оптимальных условий связывания катионных белков и пептидов варьировали либо концентрацию NaCl в пробе, либо объем вносимой суспензии полимера. Удаление катионных факторов из сыворотки оценивали по остаточной ферментативной активности лизоцима, функциональную активность комплемента – по гемолитической активности сыворотки в отношении эритроцитов кролика. Проведено сравнение микробицидностинативной и истощенной сыворотки в отношении грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* EGD.

**Результаты.** Инкубация сыворотки с равным объемом суспензии карбоксиметилцеллюлозы в присутствии 0,1 М NaCl позволяет эффективно удалять катионные полипептиды, при этом функциональная активность комплемента существенно не меняется. Истощение сыворотки по катионным факторам значительно ослабляет ее антимикробную активность по сравнению с нативной сывороткой.

**Выводы.** Разработан метод, позволяющий избирательно удалять катионные факторы из сыворотки крови. Благодаря этой процедуре становится возможной селективная оценка микробицидной активности комплемента без влияния со стороны антимикробных катионных полипептидов сыворотки.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, система комплемента, лизоцим,  $\beta$ -лизин.

**Для цитирования:** Легковой С.В., Умнякова Е.С., Берлов М.Н. Разработка метода селективной оценки микробицидной активности комплемента в сыворотке крови человека. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(1):43–48. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-07>

Система комплемента представляет собой совокупность из более, чем тридцати как мембрано-ассоциированных, так и сывороточных белков, которые в ходе каскада реакций путем ограниченного протеолиза и белок-белковых взаимодействий участвуют в гуморальной защите организма от действия чужеродных агентов [1–3]. Результатами

действия системы комплемента является опсонизация микроорганизмов, способствующая их последующему поглощению фагоцитами, индуцирование процесса воспаления (посредством анафилатоксинов C3a и C5a), удаление из циркуляции клеточного дебриса и иммунных комплексов и прямой лизис некоторых грамотрицательных бак-

терий через формирование трансмембранных пор с помощью мембраноатакующего комплекса C5b-C9. Необходимо подчеркнуть, что грамположительные бактерии являются резистентными к непосредственному литическому действию комплемента, так как толстый слой пептидогликана клеточной стенки делает их недостижимыми для его действия.

Исследование системы комплемента и механизмов ее регуляции представляет собой важную медико-биологическую проблему, поскольку избыточная или недостаточная активация комплемента может приводить к развитию той или иной патологии, включая ряд инфекционных, воспалительных, аутоиммунных заболеваний [4]. В работах, посвященных изучению системы комплемента, чаще всего в качестве исходного материала используется цельная сыворотка крови [5–7]. Такая модель представляется нам серьезным допущением, так как сыворотка содержит ряд не относящихся к комплементу катионных белков и пептидов, потенциально способных исказить представление о роли системы комплемента в нормальном функционировании организма или развитии патологий. Особенно это касается исследований, посвященных противинфекционной функции комплемента. Известно о многих микробицидных факторах в составе сыворотки, среди которых принято выделять три наиболее важных – белки системы комплемента, лизоцим и совокупность термостабильных бактерицидных пептидов, в литературе прежних лет объединяемых под общим названием «β-лизин» [1, 9, 10]. Хотя комплемент оказывает непосредственное литическое действие только на грамотрицательные бактерии, а катионные факторы сыворотки – лизоцим и β-лизин, наоборот, проявляют выраженную антимикробную активность именно в отношении грамположительных бактерий, такое функциональное разделение нельзя считать абсолютным. Так, в одной из недавних работ показано, что наряду с комплементом сыворотка крови человека содержит дополнительные неидентифицированные факторы, активные в отношении грамотрицательных бактерий [8].

Для более селективной оценки микробицидной активности системы комплемента ее реконструируют напрямую из отдельных очищенных белков, однако это сопряжено с длительными трудоемкими процедурами выделения белков комплемента из сыворотки, либо требует закупки весьма дорогих коммерческих препаратов, а кроме того, сопровождается дополнительными техниче-

скими сложностями, такими как снижение функциональной активности белков при их хранении.

**Ц е л ь и с с л е д о в а н и я** – разработка метода селективного истощения сыворотки по катионным факторам с сохранением функциональной активности комплемента.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Истощение сыворотки крови по катионным факторам карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ).** В работе использовали пулированную сыворотку крови здоровых доноров, хранившуюся при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  не более двух месяцев после получения. Удаление катионных факторов из сыворотки производили по разработанному нами методу, предполагающему инкубацию сыворотки крови с КМЦ (СМ-52, «Whatman», Великобритания). Карбоксиметилцеллюлозу предварительно уравнивали 5 мМ веронал-мединаловым буфером (VB – veronalbuffer), рН7,4, с 0,15 М NaCl, готовили суспензию путем смешивания осевшей матрицы с равным объемом буфера и добавляли в пробы с сывороткой. Для поиска оптимальных условий связывания катионных белков и пептидов варьировали либо концентрацию NaCl в пробе, либо объем вносимой суспензии КМЦ. При расчете конечной концентрации NaCl в пробе ее значение в исходной сыворотке принималось равным 0,15 М. Пробы инкубировали на ледяной бане в течение одного часа с однократным перемешиванием через 30 мин. По окончании инкубации отбирали надосадочную жидкость (истощенную сыворотку) и вносили в нее растворы VB, содержащего 0,6 М NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, и без солей, в соотношении, необходимом для достижения конечных концентраций 0,15 М для NaCl и 100 мкМ для MgCl<sub>2</sub>.

**Определение активности лизоцима.** Содержание лизоцима оценивали по его ферментативной активности в отношении бактериального пептидогликана турбидиметрическим методом по убыванию оптической плотности суспензии лиофилизированных клеток *Micrococcus luteus* при длине волны  $\lambda = 540\text{ нм}$  [11].

**Определение гемолитической активности комплемента.** Активность альтернативного пути системы комплемента определяли в гемолитическом тесте с использованием эритроцитов кролика в качестве клеток-мишеней как описано ранее [12].

**Определение антимикробной активности сыворотки.** Антимикробную активность сыворотки в отношении грамположительной бактерии

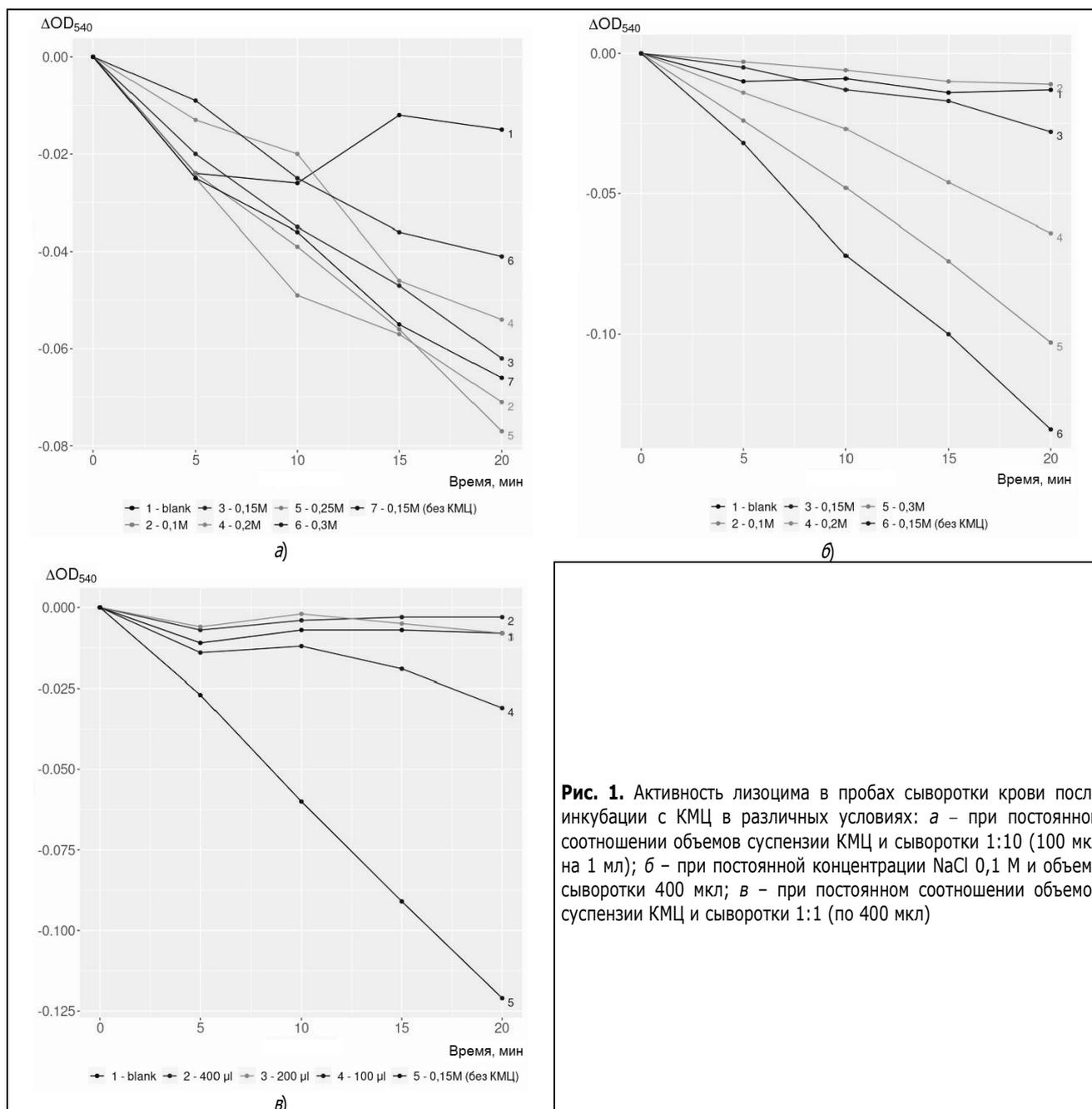
*Listeria monocytogenes* EGD определяли методом подсчета колоний как описано ранее [13] с использованием в качестве растворителя VB, содержащего 0,15 М NaCl.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подбора оптимальных условий истощения сыворотки крови по положительно заряженным молекулам было проведено три опыта. Удаление катионных факторов из сыворотки оценивали по остаточной ферментативной активности

лизоцима, который, согласно литературным данным, взаимодействует с катионообменниками слабее компонентов  $\beta$ -лизулина.

В первом опыте при фиксированном соотношении объемов суспензии КМЦ и сыворотки (1:10) варьировали концентрацию NaCl в инкубационных пробах (0,1 М, 0,15 М, 0,2 М, 0,25 М, 0,3 М). Результаты опыта не показали заметного падения активности лизоцима в пробах по сравнению с контрольной сывороткой, инкубированной без КМЦ (рис. 1,а).



**Рис. 1.** Активность лизоцима в пробах сыворотки крови после инкубации с КМЦ в различных условиях: а – при постоянном соотношении объемов суспензии КМЦ и сыворотки 1:10 (100 мкл на 1 мл); б – при постоянной концентрации NaCl 0,1 М и объеме сыворотки 400 мкл; в – при постоянном соотношении объемов суспензии КМЦ и сыворотки 1:1 (по 400 мкл)

Во втором опыте использовали наименьшую ионную силу – 0,1 М NaCl (что обеспечивает максимальное связывание катионных компонентов с КМЦ), но варьировали вносимый в пробу объем сорбента (100, 200 или 400 мкл на 400 мкл сыворотки). В этом случае было зафиксировано уменьшение активности лизоцима во всех пробах по сравнению с контролем, однако в пробе с объемом суспензии КМЦ 100 мкл (что соответствует соотношению вносимой суспензии и сыворотки 1:4) активность лизоцима частично сохранялась (рис. 1,б).

Третий опыт провели, остановившись на соотношении объемов суспензии КМЦ и сыворотки 1:1, с различными концентрациями NaCl в инкубационных пробах. Оказалось, что повышение концентрации NaCl выше 0,1 М приводит к неполному удалению лизоцима из сыворотки (рис. 1,в). Таким образом, для истощения сыворотки по катионным факторам необходима ее инкубация с равным объемом суспензии КМЦ с концентрацией NaCl 0,1 М. Именно в таких условиях была получена истощенная сыворотка, использованная для исследования микробицидной активности.

Для оценки влияния процедуры истощения сыворотки по катионным молекулам на активность в ней системы комплемента (альтернативный путь активации) использовали пробы сыворотки из последнего описанного опыта. Показано, что в пробах сыворотки, инкубированной с КМЦ при различных концентрациях NaCl, функциональная активность комплемента существенно не изменилась, и, таким образом, процедуру связывания

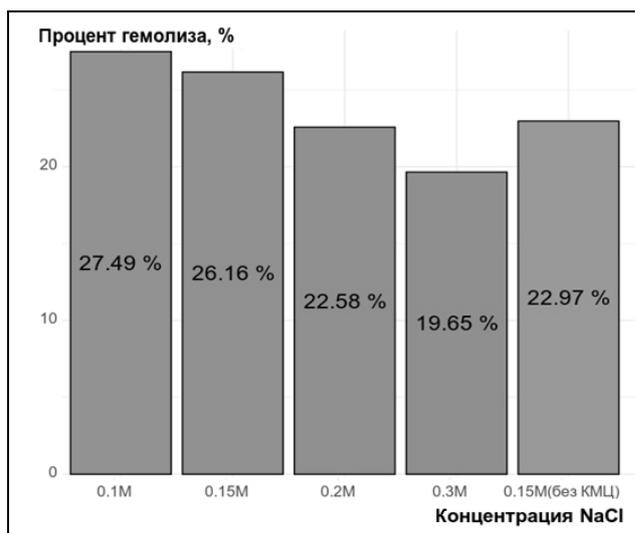


Рис. 2. Активность альтернативного пути комплемента, оцениваемая по лизису эритроцитов кролика, в пробах сыворотки крови, инкубированных с КМЦ при различных концентрациях NaCl

катионных белков и пептидов можно считать достаточно селективной (рис. 2).

После подбора условий процедуру истощения сыворотки по катионным факторам воспроизвели дважды в независимых опытах, получив аналогичные результаты (на рисунках не представлены).

Удаление из сыворотки крови катионных антимикробных факторов было также подтверждено в экспериментах по микробицидной активности нативной и истощенной сыворотки в отношении грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* EGD (таблица).

Таблица 1. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) *L. monocytogenes* в 10 мкл проб после инкубации в присутствии нативной или истощенной сыворотки

Показатель	Концентрация сыворотки						Контроль (без сыворотки)
	18%	9%	4,5%	2,25%	1,13%	0,56%	
КОЕ в пробах с нативной сывороткой	2	5	18	59	130	220	218; 225
КОЕ в пробах с истощенной сывороткой	91	209	219	237	220	223	

В то время как в пробах с нативной сывороткой имело место ингибирование жизнедеятельности микроорганизмов вплоть до разведения 2,25%, истощенная по катионным факторам сыворотка была умеренно активна только при 18%. Исследовать антимикробное действие сыворотки в более высоких концентрациях было невозможно вследствие ее разбавления в ходе проведения процедуры истощения по катионным факторам.

Полученный результат в целом согласуется с представлениями об отсутствии прямого литического действия системы комплемента на грамположительные бактерии. Таким образом, именно катионные факторы (β-лизин, лизоцим) в основном определяют антимикробную активность сыворотки против *L. monocytogenes*. Следует отметить, что даже в случае нативной сыворотки ее микробицидное действие имело место только в

отношении клеток из культуры в логарифмической фазе роста; бактерии, находящиеся в стационарной фазе роста, оказались устойчивы к действию сыворотки (иллюстрации не приведены). Подобный характер действия свойственен катионным антимикробным пептидам, преимущественно атакующим цитоплазматическую мембрану бактериальных клеток; к этой группе биомолекул относятся и компоненты  $\beta$ -лизина.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана методика, позволяющая избирательно истощать сыворотку крови человека по катионным факторам ( $\beta$ -лизин, лизоцим) при помощи суспензии КМЦ с сохранением функциональной активности системы комплемента. Обработанная таким способом сыворотка является более релевантной моделью для изучения и моделирования системы комплемента, нежели цельная сыворотка. Благодаря такому подходу становится возможным исследование в модельных системах *in vitro* микробицидного действия системы комплемента без влияния или с экспериментально контролируемым влиянием других факторов сыворотки крови, проявляющих антимикробную активность.
2. Показано, что истощенная сыворотка теряет свойственную нативной сыворотке микробицидную активность в отношении *Listeria monocytogenes*.
3. Дальнейшее исследование вышеупомянутых антимикробных компонентов сыворотки и их взаимодействия с одной стороны может помочь лучше понять некоторые молекулярные механизмы, лежащие в основе врожденного иммунитета, а с другой его результаты потенциально могут найти применение в клинической практике.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников лаборатории диагностики вирусных инфекций отделения клинической микробиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова за предоставление образцов сыворотки крови здоровых доноров.

бургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова за предоставление образцов сыворотки крови здоровых доноров.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Merle N.S., Church S.E., Fremeaux-Bacchi V., et al. Complement system. Part I. Molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* 2015; 6: 262.
2. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunol.* 2010; 11: 785–97.
3. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб: Наука, 2006; 262 с.
4. Умнякова Е.С., Пашинская Л.Д., Кренин И.А. и др. Заболевания, связанные с дисрегуляцией системы комплемента, и перспективы их лечения. *Медицинский академический журнал.* 2018; 18: 7–16.
5. Biolchi A., De Angelis G., Moschioni M., et al. Multi-component meningococcal serogroup B vaccination elicits cross-reactive immunity in infants against genetically diverse serogroup C, W and Y invasive disease isolates. *Vaccine.* 2020; 38: 7542–50.
6. Liu D., Chen Z., Yuan Y., et al. Innate immune effectors play essential roles in acute respiratory infection caused by *Klebsiellapneumonia*. *J. Immunol. Res.* 2020; 2020: 291714.
7. Chau N., Pérez-Morales D., Elhenawy W., et al. (p)ppGpp-dependent regulation of the nucleotide hydrolase PpnN confers complement resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 2020; IAI.00639-20.
8. Berends E.T., Mohan S., Mielle W.R., et al. Contribution of the complement Membrane Attack Complex to the bactericidal activity of human serum. *Mol. Immunol.* 2015; 65: 328–335.
9. Ragland S.A., Criss A.K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLOS Pathog.* 2017; 13: e1006512.
10. Donaldson D.M., Tew J.G. Beta-lysin of platelet origin. *Bacteriol. Rev.* 1977; 41: 501–513.
11. Parry R.M. (Jr.), Chandan R.C., Shahani K.M. A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965; 119: 384–386.
12. Umnyakova E.S., Gorbunov N.P., Zhakhov A.V., et al. Modulation of human complement system by antimicrobial peptide arenicin-1 from *Arenicola marina*. *Mar. Drugs.* 2018; 16: 480.
13. Берлов М.Н., Кораблева Е.С., Андреева Ю.В. и др. Лактоферрин из нейтрофилов собаки: выделение, физико-химические и антимикробные свойства. *Биохимия.* 2007; 72: 551–559.

Поступила после доработки 8 декабря 2020 г.

# DEVELOPMENT OF A METHOD FOR SELECTIVE ASSESSMENT OF COMPLEMENT MICROBICIDAL ACTIVITY IN HUMAN BLOOD SERUM

© Authors, 2021

**S.V. Legkovoy**

Post-graduate Student,

Faculty of Biology, Department of Biochemistry, Saint Petersburg State University (Saint Petersburg, Russia)

**E.S. Umnyakova**

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist,

Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine (Saint Petersburg, Russia)

**M.N. Berlov**

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist,

Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute of Experimental Medicine (Saint Petersburg, Russia)

**Background.** The ability of blood serum to suppress viability of microorganisms is primarily implemented by the presence of cationic factors (e.g. lysozyme,  $\beta$ -lysine, etc.) and complement system proteins. The complement itself is only able to cause lysis of some gram-negative bacteria, while cationic factors are predominantly active against gram-positive ones. The study of the contribution of individual antimicrobial components of blood serum and their combined action to its microbicidal activity would help to expand the understanding of the molecular mechanisms of innate immunity.

**The aim of the study.** Development of a method for selective depletion of cationic factors from serum while preserving the functional activity of the complement system.

**Materials and methods.** Pooled blood serum from healthy donors was used as the starting material. The depletion of cationic molecules from blood serum was performed by its incubation with a suspension of carboxymethylcellulose. In order to find the optimal conditions for binding of cationic proteins and peptides, either the NaCl concentration in the sample or the volume of the applied polymer suspension were varied. Removal of cationic factors from the serum was evaluated by the residual activity of lysozyme. The retention of complement was evaluated by serum hemolytic activity against rabbit red blood cells. The bactericidal activity of native and depleted serum against the gram-positive bacterium *Listeria monocytogenes* EGD was also compared.

**Results.** Incubation of serum with carboxymethylcellulose suspension taken in equal volume in the presence of 0.1 M NaCl allowed effective removal of cationic polypeptides without evident changes in complement functional activity. Antimicrobial activity of the serum depleted of cationic factors was remarkably lower compared with the native blood serum.

**Conclusions.** A method for selective removal of cationic factors from blood serum was developed. The described procedure allows evaluation of the complement microbicidal activity independently on the action of antimicrobial serum cationic polypeptides.

**Key words:** innate immunity, complement system, lysozyme,  $\beta$ -lysine.

**For citation:** Legkovoy S.V., Umnyakova E.S., Berlov M.N. Development of a method for selective assessment of complement microbicidal activity in human blood serum. Enhance functional activity of antigen-presenting cells. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(1):43–48. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-01-07>

## REFERENCES

1. Merle N.S., Church S.E., Fremeaux-Bacchi V., et al. Complement system. Part I. Molecular mechanisms of activation and regulation. *Front. Immunol.* 2015; 6: 262.
2. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunol.* 2010; 11: 785–97.
3. Kokrjakov V.N. Ocherki o vrozhdennom immunitete. SPb: Nauka, 2006; 262 s.
4. Umnyakova E.S., Pashinskaja L.D., Krenev I.A. i dr. Zabolevanija, svjazannye s disreguljaciej sistemy komplementa, i perspektivy ih lechenija. *Medicinskij akademicheskij zhurnal.* 2018; 18: 7–16.
5. Biolchi A., De Angelis G., Moschioni M., et al. Multicomponent meningococcal serogroup B vaccination elicits cross-reactive immunity in infants against genetically diverse serogroup C, W and Y invasive disease isolates. *Vaccine.* 2020; 38: 7542–50.
6. Liu D., Chen Z., Yuan Y., et al. Innate immune effectors play essential roles in acute respiratory infection caused by Klebsiella pneumoniae. *J. Immunol. Res.* 2020; 2020: 291714.
7. Chau N., Pérez-Morales D., Elhenawy W., et al. (p)ppGpp-dependent regulation of the nucleotide hydrolase PpnN confers complement resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 2020; IAI.00639-20.
8. Berends E.T., Mohan S., Mielle W.R., et al. Contribution of the complement Membrane Attack Complex to the bactericidal activity of human serum. *Mol. Immunol.* 2015; 65: 328–335.
9. Ragland S.A., Criss A.K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLOS Pathog.* 2017; 13: e1006512.
10. Donaldson D.M., Tew J.G. Beta-lysine of platelet origin. *Bacteriol. Rev.* 1977; 41: 501–513.
11. Parry R.M. (Jr.), Chandan R.C., Shahani K.M. A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965; 119: 384–386.
12. Umnyakova E.S., Gorbunov N.P., Zhakhov A.V., et al. Modulation of human complement system by antimicrobial peptide arenicin-1 from *Arenicola marina*. *Mar. Drugs.* 2018; 16: 480.
13. Berlov M.N., Korableva E.S., Andreeva Ju.V. i dr. Laktoferrin iz nejtrofiflov sobaki: vydelenie, fizi–ko–himicheskie i antimikrobnye svojstva. *Biohimija.* 2007; 72: 551–559.