

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ Fc-ФРАГМЕНТА ИММУНОГЛОБУЛИНА

В настоящей общей фармакопейной статье описаны методики определения функционального состояния Fc-фрагмента иммуноглобулина методом комплемент-зависимого гемолиза.

*Методика 2 является адаптацией методики 1 для микропланшетов при измерении комплемент-зависимого гемолиза. В статье указаны различия при проведении испытаний методикой 1 и методикой 2.*

### Реактивы

*Стабилизированная человеческая кровь.* Человеческую кровь группы 0 собирают в контейнеры с антикоагулянтom. Стабилизированную кровь хранят при температуре 4 °С не более 3 недель.

*Фосфатно-солевой буферный раствор с рН 7,2.* Растворяют 1,022 г динатрия гидрофосфата безводного Р, 0,336 г натрия дигидрофосфата безводного Р и 8,766 г натрия хлорида Р в 800 мл воды Р и доводят до объема 1000 мл этим же растворителем.

*Основной раствор магния и кальция.* Растворяют 1,103 г кальция хлорида Р и 5,083 г магния хлорида Р в воде Р и доводят до объема 25 мл этим же растворителем.

*Основной раствор барбиталового буфера.* Растворяют 207,5 г натрия хлорида Р и 25,48 г барбитала натрия Р в 4000 мл воды Р и доводят рН раствора до 7,3, используя 1 М хлороводородную кислоту. Прибавляют 12,5 мл основного раствора магния и кальция и доводят водой Р до объема 5000 мл. Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при температуре 4 °С в прозрачных емкостях.

*Альбумин-барбиталовый буферный раствор.* Растворяют 0,150 г альбумина бычьего Р в 20 мл основного раствора барбиталового буфера и доводят водой Р до объема 100 мл. Готовят непосредственно перед использованием.

*Раствор таниновой кислоты.* Растворяют 10 мг таниновой кислоты Р в 100 мл фосфатно-солевого буферного раствора с рН 7,2. Готовят непосредственно перед использованием.

*Комплемент морской свинки.* Готовят пул сыворотки из крови не менее чем 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от свернувшейся крови центрифугированием при температуре около 4 °С. Сыворотку хранят в небольших количествах при температуре ниже –70 °С. Непосредственно перед началом комплемент-зависимого гемолиза

разводят альбумин-барбиталовым буферным раствором до (125 – 200)  $\text{CH}_{50}/\text{мл}$  и хранят в ледяной бане во время испытания ( $\text{CH}_{50}$  (гемолитическая единица активности компонента) – концентрация компонента в контрольной сыворотке, вызывающая в данных условиях испытания лизис 50 % эритроцитов).

*Антиген краснухи.* Для определения титра ингибирования гемагглютинации для испытания может быть использован антиген краснухи, титр которого должен быть менее 1:256 гемагглютинирующих единиц.

**Обработка эритроцитов человека таниновой кислотой.** Эритроциты отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной человеческой крови. Промывают клетки не менее трех раз фосфатно-солевым буферным раствором с рН 7,2 и ресуспендируют в этом же растворе до получения концентрации 2 % (*об/об*). Прибавляют 0,2 мл раствора таниновой кислоты к 14,8 мл фосфатно-солевого буферного раствора с рН 7,2. Смешивают 1 объем свежеприготовленного разведения с 1 объемом суспензии эритроцитов человека и инкубируют при температуре 37 °С в течение 10 мин. Клетки отделяют центрифугированием (800 g в течение 10 мин), надосадочную жидкость удаляют, а клетки однократно промывают фосфатно-солевым буферным раствором с рН 7,2. Обработанные таниновой кислотой эритроциты ресуспендируют в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,2 до получения концентрации 1 % (*об/об*).

**Фиксация антигена на поверхности эритроцитов, обработанных таниновой кислотой.** К подходящему объему ( $V_s$ ) суспензии эритроцитов, обработанных таниновой кислотой, добавляют антиген краснухи (0,2 мл на 1,0 мл суспензии клеток) и инкубируют при температуре 37 °С в течение 30 мин. Клетки отделяют центрифугированием (800 g в течение 10 мин) и удаляют надосадочную жидкость. Прибавляют альбумин-барбиталовый буферный раствор в объеме, равном объему удаленного супернатанта, клетки ресуспендируют, отделяют, как описано выше, и повторяют операцию промывки. Клетки ресуспендируют с помощью альбумин-барбиталового буферного раствора, используя объем, эквивалентный  $3/4 V_s$ , получая таким образом начальный объем (раствор  $V_i$ ).

Смешивают 900 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора с 100 мкл раствора  $V_i$ , получая таким образом объем ( $V_r$ ), и определяют исходную оптическую плотность при длине волны 541 нм ( $A$ ). Разводят  $V_r$  с коэффициентом разведения, равным  $A$ , с помощью альбумин-барбиталового буферного раствора, получая таким образом конечный скорректированный объем  $V_f = V_r \cdot A$  сенсibilизированных человеческих эритроцитов и доводя значение  $A$  до  $1,0 \pm 0,1$  для десятикратного

разведения.

**Связывание антителами сенсibilизированных эритроцитов.** Готовят последовательно в двух повторностях нижеперечисленные растворы, используя для каждого из них отдельную одноразовую кювету или пробирку.

*Испытуемые растворы.* При необходимости доводят значение рН испытуемого раствора иммуноглобулина до 7,0.

При выполнении методики 1 объемы испытуемого образца разводят альбумин-барбиталовым буферным раствором таким образом, чтобы в 900 мкл раствора содержалось от 30 мг до 40 мг иммуноглобулина.

При выполнении методики 2 объемы испытуемого образца разводят альбумин-барбиталовым буферным таким образом, чтобы в 1200 мкл раствора содержалось от 15 мг до 30 мг иммуноглобулина.

*Растворы сравнения.* Готовят так же, как и испытуемые растворы с использованием СО ФЕАЭС человеческого иммуноглобулина для оценки функционального состояния Fc-фрагмента.

*Контроль комплемента.* Альбумин-барбиталовый буферный раствор используют в таком же объеме, что и испытуемый раствор.

При выполнении методики 1 к содержимому каждой кюветы или пробирки прибавляют по 100 мкл сенсibilизированных человеческих эритроцитов и хорошо перемешивают.

Инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин, прибавляют 1000 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора, отделяют клетки центрифугированием (1000 g в течение 10 мин) и удаляют 1900 мкл надосадочной жидкости. Прибавляют 1900 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора и повторяют операцию отмывки, оставляя объем 200 мкл. Испытуемые образцы могут храниться в герметично закупоренных кюветах (пробирках) при температуре 4 °С не более 24 ч.

При выполнении методики 2 к содержимому каждой кюветы или пробирки прибавляют по 300 мкл сенсibilизированных человеческих эритроцитов и хорошо перемешивают (конечная концентрация иммуноглобулина колеблется в пределах от 10 мг/мл до 20 мг/мл). Инкубируют при температуре от 15 °С до 25 °С в течение 15 мин, прибавляют 1500 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора, отделяют клетки центрифугированием (1000 g в течение 10 мин) и удаляют надосадочную жидкость. Прибавляют 3000 мкл альбумин-барбиталового буферного раствора и повторяют всю операцию промывки четыре раза, оставляя объем 300 мкл. Испытуемые образцы могут храниться в герметично закупоренных пробирках при температуре 4 °С не более 24 ч.

**Комплемент-зависимый гемолиз.** При выполнении методики 1 для измерения гемолиза к испытуемому образцу прибавляют 600 мкл предварительно нагретого до температуры 37 °С альбумин-барбиталового буферного раствора, тщательно ресуспендируют клетки путем пипетирования (не менее пяти раз) и помещают кювету в термостатированный держатель кювет спектрофотометра. Через 2 мин прибавляют 200 мкл разведенного комплемента морских свинок (125 – 200) СН<sub>50</sub>/мл, двукратно пипетируют для перемешивания и сразу начинают регистрацию оптической плотности через установленные промежутки времени при длине волны 541 нм с использованием альбумин-барбиталового буферного раствора в качестве компенсационного раствора. Измерение прекращают при очевидном прохождении точки перегиба графика зависимости оптической плотности от времени.

При выполнении методики 2 для измерения степени гемолиза к испытуемому образцу прибавляют 900 мкл предварительно нагретого до температуры 37 °С альбумин-барбиталового буферного раствора, осторожно ресуспендируют клетки путем пипетирования (не менее пяти раз). Микропланшеты должны быть предварительно нагреты до температуры 37 °С. Переносят по 240 мкл каждого раствора в 4 лунки микропланшета и инкубируют при температуре 37 °С в течение 6 мин, осторожно встряхивая каждые 10 с. В каждую лунку микропланшета прибавляют по 60 мкл разведенного комплемента морских свинок 150 СН<sub>50</sub>/мл, тщательно перемешивают 10 с и сразу начинают регистрацию оптической плотности при длине волны 541 нм при температуре 37 °С; измерение проводят каждые 20 с. Измерение прекращают при очевидном прохождении точки перегиба графика зависимости оптической плотности от времени.

**Оценка.** Для каждой кюветы (пробирки, лунки) определяют угол наклона ( $S$ ) кривой гемолиза в районе точки перегиба путем сегментации участка с наибольшим наклоном на подходящие временные отрезки (например,  $\Delta t = 1$  мин) и вычисляют значения  $S$  между соседними точками пересечений, выраженные как изменения оптической плотности в минуту ( $\Delta A/\text{мин}$ ). Наибольшее значение  $S$  является экспериментально установленным углом наклона кривой гемолиза ( $S_{\text{exp}}$ ). Кроме того, определяют оптическую плотность в начале измерения ( $A_s$ ) путем экстраполяции кривой, практически линейной и параллельной оси времени в течение первых нескольких минут. Корректируют значение  $S_{\text{exp}}$  по формуле:

$$S' = \frac{S_{\text{exp}}}{A_s}.$$

Рассчитывают среднее арифметическое значений  $S'$  для каждого образца (испытуемого раствора и раствора сравнения).

Рассчитывают индекс функционального состояния Fc-фрагмента ( $I_{Fc}$ ) по формуле:

$$I_{Fc} = \frac{100 \cdot (\bar{S}' - \bar{S}'_c)}{\bar{S}'_s - \bar{S}'_c},$$

где:  $\bar{S}'$  – среднее арифметическое скорректированного угла наклона для испытуемого раствора;

$\bar{S}'_s$  – среднее арифметическое скорректированного угла наклона для раствора сравнения;

$\bar{S}'_c$  – среднее арифметическое скорректированного угла наклона для контроля компонента.

Рассчитывают индекс функционального состояния Fc-фрагмента для испытуемого образца: значение должно быть не менее указанного в сопроводительной документации на стандартный образец.