

2.1.11.38. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА

Общая фармакопейная статья распространяется на метод определения антикомплементарной активности иммуноглобулинов человека, который основан на способности высокомолекулярных и денатурированных белков (агрегатов) связывать комплемент в отсутствие комплексов антиген–антитело и, таким образом, препятствовать лизису сенсibilизированных эритроцитов.

Для определения антикомплементарной активности иммуноглобулина человека фиксированное количество испытуемого образца (содержащее 10 мг иммуноглобулина) инкубируют с определенным количеством комплемента морских свинок (20 CH_{50}); определяют активность остаточного комплемента. Гемолитическая единица активности комплемента (CH_{50}) представляет собой количество комплемента, вызывающее в данных условиях испытания лизис 50 % оптимально сенсibilизированных эритроцитов.

Антикомплементарную активность в процентах выражают как расход комплемента в испытуемом образце по отношению к контрольному комплементу (контрольному раствору комплемента), принятому за 100 %. Допустимый предел связывания комплемента – не более 50 % (не более 1 CH_{50} /мг белка).

РЕАКТИВЫ

Раствор магния и кальция. Растворяют 1,103 г кальция хлорида *P* и 5,083 г магния хлорида *P* в воде *P* и доводят тем же растворителем до объема 25,0 мл.

Буферный раствор барбитала натрия. Растворяют 207,5 г натрия хлорида *P* и 25,48 г барбитала натрия *P* в 4000 мл воды *P* и доводят pH раствором 103 г/л хлороводородной кислоты *P* до значения 7,3. К полученному раствору прибавляют 12,5 мл раствора магния и кальция и доводят объем раствора водой *P* до 5000 мл. Фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Хранят при температуре 4 °С в стеклянных флаконах.

Желатина раствор А. Растворяют 12,5 г желатина *P* примерно в 800 мл воды *P*, нагревают на водяной бане до кипения и охлаждают до 20 °С. Полученный раствор доводят водой *P* до объема 10 л и фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Хранят при температуре 4 °С. Используют только прозрачные растворы.

Желатина раствор Б. В коническую колбу помещают 1 г желатина *P*, прибавляют 200 мл воды *P*, выдерживают в течение 40 мин, нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения и охлаждают до комнатной температуры. Полученный раствор доводят водой *P* до 250 мл и фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Хранят при температуре 4 °С. Используют только прозрачные растворы.

Цитратный раствор. Растворяют 8,0 г натрия цитрата *P*, 4,2 г натрия хлорида *P* и 20,5 г глюкозы *P* в 750 мл воды *P*, доводят pH до значения 6,1 раствором 100 г/л лимонной кислоты моногидрата *P* и доводят объем раствора водой *P* до 1000 мл.

Желатин-барбиталовый буферный раствор. Смешивают буферный раствор барбитала натрия и желатина раствор А в соотношении 1:4, при необходимости доводят pH до значения 7,3 раствором 40 г/л натрия гидроксида *P* или раствором 103 г/л хлороводородной кислоты. Раствор хранят при температуре 4 °С и используют свежеприготовленным.

Желатин-солевой буферный раствор. Растворяют 8,5 г натрия хлорида *P*, 0,1 г кальция хлорида безводного *P*, 40 мг магния хлорида *P* в воде *P*, прибавляют 250 мл раствора желатина Б, доводят объем раствора водой *P* до 1000 мл. Доводят pH до значения

7,2 раствором 40 г/л *натрия гидроксида Р*. Раствор хранят при температуре 4 °С и используют свежеприготовленным.

Стабилизированная кровь барана. Смешивают кровь барана и цитратный раствор в соотношении 1:1, перемешивают. Хранят при температуре 4 °С. Стабилизированную кровь барана можно использовать в течение 28 дней, но не ранее чем через 7 дней после взятия.

Гемолитическая сыворотка. Иммунная сыворотка против эритроцитов барана, которую получают путем иммунизации кроликов.

Комплемент морских свинок. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от сгустка крови центрифугированием при температуре 4 °С. Хранят в небольших количествах при температуре ниже –70 °С.

МЕТОД

В испытании на всех этапах используют один и тот же буферный раствор; может быть использован желатин-барбиталовый буферный раствор или желатин-солевой буферный раствор.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТИЗОВАННОЙ 5 % СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА

Эритроциты барана отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной крови барана в течение пяти минут при 1000 g. Осадок эритроцитов промывают не менее трех раз объемом буферного раствора до получения бесцветной промывной жидкости. Отбирают определенный объем отмытых эритроцитов и смешивают с рассчитанным количеством буферного раствора для получения 5 % суспензии (об/об).

Определение плотности клеточной суспензии

Прибавляют 0,2 мл полученной суспензии эритроцитов к 2,8 мл *воды Р*, перемешивают, центрифугируют в течение пяти минут при 1000 g и измеряют оптическую плотность раствора (2.1.2.24) на спектрофотометре при длине волны 541 нм. Суспензия содержит около 1×10^9 клеток/мл и пригодна для испытания, если оптическая плотность надосадочной жидкости составляет $0,62 \pm 0,01$.

При необходимости, корректируют плотность суспензии эритроцитов барана до 1×10^9 клеток/мл:

– прибавлением необходимого количества отмытых эритроцитов, если оптическая плотность ниже 0,61;

– прибавлением рассчитанного объема буферного раствора, если оптическая плотность выше 0,63.

Объем буферного раствора, необходимый для корректировки плотности суспензии эритроцитов вычисляют по формуле:

$$\frac{V_n \cdot A}{0,62} - V_n$$

где: V_n – начальный объем суспензии в миллилитрах;
 A – значение оптической плотности исходной суспензии;
 0,62 – целевое значение оптической плотности.

ТИТРОВАНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

Готовят серию разведений гемолитической сыворотки, в соответствии с таблицей 2.1.11.38.-1 (значения разведений гемолитической сыворотки могут быть изменены).

Таблица 2.1.11.38.-1. – Порядок приготовления разведений гемолитической сыворотки

Разведение гемолитической сыворотки	Используемые растворы		
	объем буферного раствора (мл)	гемолитическая сыворотка	
		разведение	объем (мл)
7,5	0,65	неразбавленный	0,1
10	0,90	неразбавленный	0,1
75	1,80	7,5	0,2
100	1,80	10	0,2
150	1,00	75	1,0
200	1,00	100	1,0
300	1,00	150	1,0
400	1,00	200	1,0
600	1,00	300	1,0
800	1,00	400	1,0
1200	1,00	600	1,0
1600	1,00	800	1,0
2400	1,00	1200	1,0
3200*	1,00	1600	1,0
4800*	1,00	2400	1,0
* – необходимо удалить 1,0 мл смеси			

В каждую пробирку серии разведений гемолитической сыворотки, начиная с разведения 1:75, прибавляют по 1,0 мл стандартизованной суспензии эритроцитов барана 5 %, перемешивают и инкубируют при 37 ° С в течение 30 мин.

По окончании инкубации из каждой пробирки по 0,2 мл инкубированных проб переносят в новые пробирки, прибавляют по 1,10 мл буферного раствора и по 0,2 мл предварительно приготовленного раствора комплемента морской свинки (например, разведение 1:150). Испытание выполняют в двух повторностях.

Контрольная проба без гемолиза. В три пробирки помещают по 1,4 мл буферного раствора и по 0,1 мл стандартизованной 5 % суспензии эритроцитов барана.

Контрольная проба с полным гемолизом. В три пробирки помещают по 1,4 мл воды Р и по 0,1 мл стандартизованной 5 % суспензии эритроцитов барана.

Все пробирки инкубируют при температуре 37 °С в течение 60 мин и центрифугируют в течение пяти минут при 1000 g. Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) надосадочной жидкости на спектрофотометре при длине волны 541 нм.

Рассчитывают степень гемолиза в процентах в каждой пробирке по формуле:

$$\frac{A_a - A_1}{A_b - A_1} \times 100$$

где A_a – оптическая плотность разведений гемолитической сыворотки;
 A_b – среднее значение оптической плотности контрольных проб с полным гемолизом;
 A_1 – среднее значение оптической плотности контрольных проб без гемолиза.

Строят график, откладывая по оси ординат степень гемолиза в процентах, а по оси абсцисс – обратные значения соответствующего разведения гемолитической сыворотки. По графику определяют минимальное разведение, при котором дальнейшее увеличение количества гемолитической сыворотки не вызывает существенного повышения степени гемолиза. Это разведение принимают за одну минимальную гемолитическую единицу (1 МГЕ) в 1,0 мл.

Результаты титрования гемолитической сыворотки считают достоверными, если максимальная степень гемолиза находится в пределах от 50 % до 70 %. Если максимальная степень гемолиза отличается от указанного диапазона, титрование повторяют с использованием менее или более разбавленного раствора комплемента морских свинок, соответственно.

В дальнейшем для приготовления суспензии оптимально сенсibilизированных эритроцитов барана используют разведение гемолитической сыворотки, содержащее 2 МГЕ/мл (например, если за 1 МГЕ/мл принимают разведение 1:500, то 2 МГЕ/мл содержится в разведении 1:250).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНО СЕНСIBILИЗИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ БАРАНА (ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ)

Гемолитическую сыворотку, разведенную до содержания 2 МГЕ/мл, прибавляют к стандартизированной 5 % суспензии эритроцитов барана в соотношении 1:1 и перемешивают. Инкубируют при температуре 37 °С в течение 15 мин, хранят при температуре 4 °С и используют в течение шести часов.

ТИТРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА

Готовят исходное разведение комплемента морских свинок (например, 1:250) с использованием буферного раствора, далее из него готовят ряд разведений в двух повторностях в соответствии с таблицей 2.1.11.38.-2.

Таблица 2.1.11.38.-2. – *Порядок приготовления разведений комплемента*

Номера пробирок	Объем разведения комплемента (например, 1:250) (мл)	Объем буферного раствора (мл)
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7

Номера пробирок	Объем разведения комплемента (например, 1:250) (мл)	Объем буферного раствора (мл)
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1

Контрольная проба без гемолиза. В три пробирки помещают по 1,3 мл буферного раствора.

Контрольная проба с полным гемолизом. В три пробирки помещают по 1,3 мл воды Р.

В каждую пробирку (пробирки с 1 по 12 с разведениями комплемента и пробирки с контрольными пробами) прибавляют по 0,2 мл гемолитической системы, тщательно перемешивают и инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 60 мин; затем охлаждают 10 мин на ледяной бане и центрифугируют в течение пяти минут при 1000 g.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) надосадочной жидкости на спектрофотометре при длине волны 541 нм.

Степень гемолиза (Y) рассчитывают по формуле:

$$\frac{A_c - A_1}{A_b - A_1}$$

- где: A_c — оптическая плотность разведений комплемента (пробирки с 1 по 12);
 A_b — среднее значение оптической плотности контрольных проб с полным гемолизом;
 A_1 — среднее значение оптической плотности контрольных проб без гемолиза.

С помощью программного обеспечения или на миллиметровой бумаге с логарифмическим масштабом строят график со значениями $Y/(1 - Y)$ по оси абсцисс и количеством разведенного комплемента морских свинок в миллилитрах по оси ординат. Получают оптимизированную кривую, соответствующую нанесенным точкам, и определяют ординату для дозы комплемента, приводящей к 50 % гемолизу, т.е. $Y/(1 - Y) = 1$.

Активность комплемента в исходном растворе, выраженную в гемолитических единицах ($CH_{50}/мл$), вычисляют по формуле:

$$\frac{C_d}{C_a \times 5}$$

- где: C_d — величина, обратная степени разведения комплемента;
 C_a — объем разведенного комплемента, вызывающий 50 % гемолиз в миллилитрах;
5 — множитель для учета количества эритроцитов.

Результат титрования комплемента считают достоверным если:

- график в диапазоне значений степени гемолиза от 0,15 до 0,85 представляет собой прямую линию;
- наклон линейного участка графика составляет от 0,15 до 0,40, предпочтительно в интервале от 0,18 до 0,30.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ

Готовят раствор комплемента, содержащего 100 СН₅₀/мл, путем разбавления буферным раствором комплемента морских свинок в зависимости от его исходной активности.

Проверяют рН испытуемого образца иммуноглобулина человека (2.1.2.3). При значении рН менее 7,0, допустимо проведение его корректировки на основании данных по валидации.

Испытуемый раствор. К 0,2 мл испытуемого образца с концентрацией иммуноглобулина 50 мг/мл прибавляют 0,6 мл буферного раствора.

Если концентрация иммуноглобулина в испытуемом образце отличается от 50 мг/мл, объем испытуемого образца корректируют в сторону уменьшения или увеличения. Точный объем испытуемого образца иммуноглобулина в миллилитрах рассчитывают по формуле:

$$\frac{50 \times 0,2}{C}$$

- где 50 – необходимое содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина, в миллиграммах на миллилитр;
- 0,2 – объем испытуемого образца иммуноглобулина, взятый для испытания, в миллилитрах;
- C – фактическое содержание белка в испытуемом образце иммуноглобулина, в миллиграммах на миллилитр.

Для приготовления испытуемого раствора объем пробы доводят буферным раствором до 0,8 мл.

Готовят положительный и отрицательный контроли в соответствии с указаниями по применению *СО ФЕАЭС иммуноглобулина человека (антикомплемментарная активность)*.

Для приготовления контрольного раствора комплемента (в двух повторностях) в две пробирки вносят по 0,8 мл буферного раствора.

В каждую пробирку (пробирки с испытуемым раствором, пробирки с положительным и отрицательным контролем, пробирки с контрольным раствором комплемента) прибавляют по 0,2 мл раствора комплемента, содержащего 100 СН₅₀/мл. Конечный объем проб должен составлять 1,0 мл.

Пробирки инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 60 мин.

По истечении срока инкубации готовят разведения 1:50 с использованием буферного раствора для проб с испытуемым раствором и контрольным раствором комплемента. Разведения положительного и отрицательного контролей проводят в соответствии с указаниями по применению *СО ФЕАЭС иммуноглобулина человека (антикомплемментарная активность)*.

Проводят определение остаточной активности комплемента (в двух повторностях) в соответствии с таблицей 2.1.11.38.-3.

Таблица 2.1.11.38.-3. – Порядок подготовки проб для определения остаточной активности комплемента

Номера пробирок	Объем пробы (мл)	Объем буферного раствора (мл)
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1

Контрольная проба без гемолиза. В три пробирки помещают по 1,3 мл буферного раствора.

Контрольная проба с полным гемолизом. В три пробирки помещают по 1,3 мл воды Р.

В каждую пробирку (пробирки с 1 по 12 с пробами для определения остаточной активности комплемента, пробирки с контрольными пробами и пробирки с контрольным раствором комплемента) прибавляют по 0,2 мл гемолитической системы, тщательно перемешивают, инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 60 мин и центрифугируют в течение 5 мин при 1000 g.

Измеряют оптическую плотность (2.1.2.24) надосадочной жидкости на спектрофотометре при длине волны 541 нм.

Вычисляют активность комплемента в гемолитических единицах (CH₅₀/мл) для испытуемого раствора, положительного и отрицательного контролей и в контрольном растворе комплемента (см. раздел *Титрование комплемента* данной общей фармакопейной статьи).

Антикомплементарную активность испытуемого образца иммуноглобулина, положительного и отрицательного контролей в процентах вычисляют относительно активности комплемента в контрольном растворе комплемента, принятой за 100 %:

$$\frac{a-b}{a} \cdot 100$$

где a — среднее значение активности комплемента в контрольном растворе комплемента, в CH₅₀ на миллилитр;
 b — среднее значение активности комплемента в испытуемом растворе или положительном контроле или отрицательном контроле, в CH₅₀ на миллилитр.

При необходимости рассчитывают антикомплементарную активность испытуемого образца иммуноглобулина в CH₅₀/мг белка:

$$\frac{20 \cdot \left(\frac{a-b}{a} \right)}{10}$$

- где
- 20 – количество комплемента, взятого в испытание, в CH_{50} ;
 - a – среднее значение активности комплемента в контрольном растворе комплемента, в CH_{50} на миллилитр;
 - b – среднее значение активности комплемента в испытуемом растворе или положительном контроле или отрицательном контроле, в CH_{50} на миллилитр;
 - 10 – количество белка иммуноглобулина, взятого в испытание, в миллиграммах.

Результаты испытаний считают достоверными, если:

- антикомплементарная активность отрицательного контроля и положительного контроля находится в пределах, указанных в инструкции к *СО ФЕАЭС*;
- активность комплемента в контрольном растворе комплемента находится в пределах от 80 $\text{CH}_{50}/\text{мл}$ до 120 $\text{CH}_{50}/\text{мл}$.