

© Позднякова А.Н. и др., 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 616.895.8, 577.151.62, 54.066

<https://doi.org/10.30629/2618-6667-2024-22-6-54-62>

Сравнительное исследование свойств системы комплемента в крови больных шизофренией: сопоставление результатов активации комплемента в присутствии инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и определение терминального комплекса комплемента методом иммуноферментного анализа

А.Н. Позднякова, И.Н. Отман, С.А. Зозуля, Н.В. Кост, Е.Г. Черемных
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Автор для корреспонденции: Анастасия Николаевна Позднякова, fanianastya@gmail.com

Резюме

Обоснование: по данным многочисленных исследований, система комплемента (СК) вовлечена в развитие патологического процесса при многих психических заболеваниях. Одним из методов изучения влияния компонентов СК на развитие патологического процесса при шизофрении является разработанный авторами способ оценки функциональной активности СК с помощью фиксирования гибели инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в растворах сыворотки/плазмы крови посредством образования на поверхности простейших терминального компонента каскада СК — мембраноатакующего комплекса (МАК). **Цель исследования:** изучение особенностей работы СК у больных шизофренией путем сопоставления оценки действия сыворотки/плазмы на *Tetrahymena pyriformis* и иммуноферментного анализа, определяющего количественное содержание терминального комплекса комплемента в крови пациентов. **Пациенты и методы:** в исследование были включены 28 женщин в возрасте 16–40 лет с диагнозом параноидной шизофрении (F20 по МКБ-10), обследованных до начала психофармакотерапии. Функциональную активность СК (faCS) оценивали на приборе БиоЛаТ, фиксирующем скорость гибели инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Количественное определение терминального комплекса комплемента (Terminal complement complex, ТСС) в плазме крови оценивали с помощью набора ELISA KIT НК328. **Результаты:** результаты двух методов определения свойств СК оказались только частично сопоставимы. В плазме пациентов были обнаружены значительные колебания faCS: у 25% обследованных показатели оказались выше нормы, у 32% — ниже. Варьирование солевого состава среды инкубации простейших показало активацию СК по альтернативному пути. Медиана ТСС в группе больных в два раза превышала этот показатель в группе контроля. Методом ранговой корреляции Спирмена установлена слабая связь между параметрами faCS и ТСС, что может свидетельствовать как о присутствии в терминальном комплексе комплемента несвязанного МАК, так и о вкладе в активацию компонентов классического и лектинового путей СК. **Заключение:** подтвержденная вовлеченность СК в патогенез шизофрении, предположительно, может служить основанием для использования в терапии препаратов, снижающих уровень терминального комплекса СК.

Ключевые слова: шизофрения, иммунитет, комплемент, инфузории, мембраноатакующий комплекс, воспаление

Для цитирования: Позднякова А.Н., Отман И.Н., Зозуля С.А., Кост Н.В., Черемных Е.Г. Сравнительное исследование свойств системы комплемента в крови больных шизофренией: сопоставление результатов активации комплемента в присутствии инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и определения терминального комплекса комплемента методом иммуноферментного анализа. *Психиатрия*. 2024;22(6):54–62. <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2024-22-6-54-62>

RESEARCH

УДК 616.895.8, 577.151.62, 54.066

<https://doi.org/10.30629/2618-6667-2024-22-6-54-62>

Comparative Study of the Complement System Properties in the Schizophrenia Patients' Blood: the Results of Complement Activation in the Presence of *Tetrahymena Pyriformis* Ciliates and Determination of the Terminal Complement Complex by Enzyme Immunoassay

A.N. Pozdnyakova, I.N. Otman, S.A. Zozulya, N.V. Kost, E.G. Cheremnykh
FSBSI "Mental Health Research Centre", Moscow, Russia

Corresponding author: Anastasia N. Pozdnyakova, fanianastya@gmail.com

Summary

Background: according to the numerous data the complement system (CS) is involved in many mental disorders pathological process development. However, the results are contradictory and require the new methodological approaches being established.

One way of studying CS components impact on the pathological process in schizophrenia development is elaborated by the authors the method of assessing the CS functional activity by the recording the biological objects *Tetrahymena pyriformis* ciliates death in serum/plasma solutions through the CS cascade formation of the terminal component — the membrane attack complex (MAC) on the protozoa membrane. **Aim:** to study the specificities of the schizophrenia patients CS functioning by comparing the results of serum/plasma assessing effect on *Tetrahymena pyriformis* and enzyme immunoassay, which determines the quantitative content of the terminal complement complex in the patients' blood. **Patients and methods:** the study included 28 women aged 16–40 years with paranoid schizophrenia (F20 according to ICD-10), examined before the start of psychopharmacotherapy. The functional activity of CS (faCS) was assessed using the BioLaT device, which records the death rate of *Tetrahymena pyriformis* ciliates. Quantitative determination of the terminal complement complex (TTC) in blood plasma was assessed using the ELISA KIT HK328. **Results:** the results of the two methods of clarifying CS features were only partially comparable. FaCS in patient plasma is characterized by significant fluctuations: 25% of the examined patients were above the normal rate, 32% — below. The alternative pathway of CS activation was indicated by varying the salt composition of the protozoa incubation medium. The TCC midpoint in the patients' group was twice as high as in reference group. According to Spearman's rank correlation, a weak relationship was established between the faCS and TCC parameters, which may be a sign of fluid-phase MAC presence in the terminal complement complex and also the contribution of the classical and lectin CS pathways components to the activation. **Conclusion:** CS involvement in pathogenesis of schizophrenia, presumably, can serve as a basis for complex treatment using medicine to decrease the terminal CS level.

Keywords: schizophrenia, immunity, complement, ciliates, MAC, neuroinflammation

For citation: Pozdnyakova A.N., Otman I.N., Zozulya S.A., Kost N.V., Cheremnykh E.G. Comparative Study of the Complement System Properties in the Schizophrenia Patients' Blood: the Results of Complement Activation in the Presence of *Tetrahymena Pyriformis* Ciliates and Determination of the Terminal Complement Complex by Enzyme Immunoassay. *Psychiatry (Moscow) (Psikhiatriya)*. 2024;22(6):54–62. (In Russ.). <https://doi.org/10.30629/2618-6667-2024-22-6-54-62>

ВВЕДЕНИЕ

Система комплемента (СК) является одним из центральных компонентов врожденного иммунитета. Она состоит из более чем 50 различных белков, как растворимых в плазме крови, так и экспрессируемых на мембранах клеток хозяина, в том числе выполняющих регуляторные функции [1]. Белки СК крови синтезируются в основном в гепатоцитах, частично в моноцитах, адипоцитах и энтероцитах. Они составляют примерно 15% глобулинов плазмы крови.

СК выполняет множество функций, одна из которых заключается в защите организма от бактериальных и вирусных инфекций. СК обеспечивает связь между врожденным и адаптивным иммунитетом, участвует в регуляции иммунного ответа, распознавании поврежденных или апоптотических клеток, фагоцитозе, клиренсе иммунных комплексов, инициации синтеза медиаторов воспаления [2].

Выявлена тесная взаимосвязь СК с другими протеолитическими системами, и в первую очередь с системой гемостаза [3]. Показано, что активированные компоненты коагуляции — тромбин, факторы VIII — XII повышают содержание активных компонентов СК [4]. Взаимосвязь с калликреин-кининовой [5] и ренин-ангиотензин-альдостероновой [6] системами также ускоряет образование активных компонентов комплемента [7].

При активации белки СК взаимодействуют между собой и формируют сложный каскад биохимических реакций, в котором каждый последующий фермент образуется за счет протеолиза предыдущего.

В норме активация СК представляет собой регулируемый процесс, точность настройки которого во многом обеспечивается активатором и ингибиторами системы. Чрезмерная или, наоборот, недостаточная активация СК может усугублять патологический процесс,

усиливать развитие периферического воспаления и нейровоспаления [8].

В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что активация СК может осуществляться тремя путями — классическим, лектиновым и альтернативным [9]. Центральным белком СК является белок острой фазы воспаления С3. Образовавшиеся в каскаде реакций анафилотоксины С3а и С5а обладают провоспалительным действием и повышают сосудистую проницаемость. Отделяющиеся в каскаде опсонины обеспечивают связь с поверхностью патогена для дальнейшего формирования мембраноатакующего комплекса (МАК) и создания метки для фагоцитирующих клеток.

Классический путь активируется при связывании стартового белка C1q (компонент комплемента 1q) с иммунными комплексами антиген–антитело, лектиновый путь не требует участия антител, связь с полисахаридами поверхности патогенов происходит через лектины (связывающий маннозу лектин, Mannan-binding lectin, MBL) или группу фиколинов. Важно отметить, что белковые компоненты начального этапа классического и лектинового путей зависят от ионов кальция.

Альтернативный механизм действует без участия антител через связывание конвертазы C3bBb с компонентами мембран патогена или гидратным комплексом белка C3, который в небольших количествах всегда присутствует в крови благодаря процессу «холостой активации» C3 жидкой фазы. Альтернативный путь зависит от ионов магния. Результатом активации СК становится формирование на поверхности чужеродной клетки МАК, представляющего собой пору или воронку в мембране патогена, собранную из белков C5b, C6, C7, C8, C9, вследствие чего осмотическое давление в клетке-патогене изменяется, и она разрушается. Пути активации СК регулируются ингибиторами комплемента на поверхности клеток хозяина, которые

предотвращают чрезмерную активность системы. При неэффективной регуляции может образовываться избыточное количество анафилотоксинов, что способствует развитию воспаления, а также формированию избыточного количества терминальных комплексов (рис. 1).

Существуют данные, свидетельствующие о синтезе компонентов СК в мозге [10]. Показано, что в нормальных физиологических условиях СК выполняет нейропротекторную роль и участвует в регуляции нейропластичности. Микроглия является одним из основных индукторов образования C3 при психических и нейродегенеративных заболеваниях (шизофрения [11], болезнь Альцгеймера [12], болезнь Паркинсона [13], аутизм [14]). Продуцентами C3 становятся также активированные астроциты, особенно в ответ на воздействие LPS (липополисахаридов). В процессе каскада расщепления C3 вырабатываются анафилотоксины C3a и C5a, которые регулируют активацию глиальных клеток и хемотаксис (рецепторы C3aR и C5aR). Несмотря на то что пути СК частично регулируются ингибиторами комплемента, которые предотвращают нежелательную активность системы, при неэффективной регуляции образование анафилотоксинов может привести к патологическому воспалению, а также излишнему образованию литических терминальных комплексов МАК. В ЦНС это может приводить к нейровоспалению и снижению когнитивных функций, связанных со многими нейродегенеративными заболеваниями.

Не так давно была открыта защитная роль умеренного количества комплексов эффекторных белков СК

с их рецепторами (C3a-rC3a и C5a-rC5a) на мембранах нейронов и астроглии [15].

Нейропротекторное действие этих комплексов состоит в ингибировании глутамат-опосредованной активации каспазы-3 и, соответственно, апоптоза нейронов. Также защитную роль при воздействии нейротоксических агентов, таких как фибриллярные образования β -амилоида, играет C1q-ингибитор (C1q-INH), который предотвращает активацию классического и лектинового путей СК.

Комплемент принимает непосредственное участие в синаптическом прунинге (synapse pruning), т.е. процессе обрезки избыточных синапсов с целью оптимизации нейронных сетей, необходимых для нормального развития и функционирования мозга [16]. В ЦНС факторы комплемента влияют на фагоцитоз избыточных (или неэффективных) нейронов и трансформацию дендритных шипиков, а также усиленную глиальными клетками секрецию провоспалительных цитокинов, вызывающих повреждение и гибель нейронов. Сокращение синаптических связей происходит главным образом в постнатальный период [17] онтогенеза и опосредуется через классический путь активации СК. Основным источником синтеза компонента классического пути C1q — микроглия. C1q локализуется в непосредственной близости от дендритных шипиков и помечает синапсы для последующей активации классического пути, что приводит к отложению продуктов расщепления C3, особенно iC3b, и дальнейшему поглощению меченого синапса микроглией, либо втягиванию излишних шипиков. Существует предположение, что

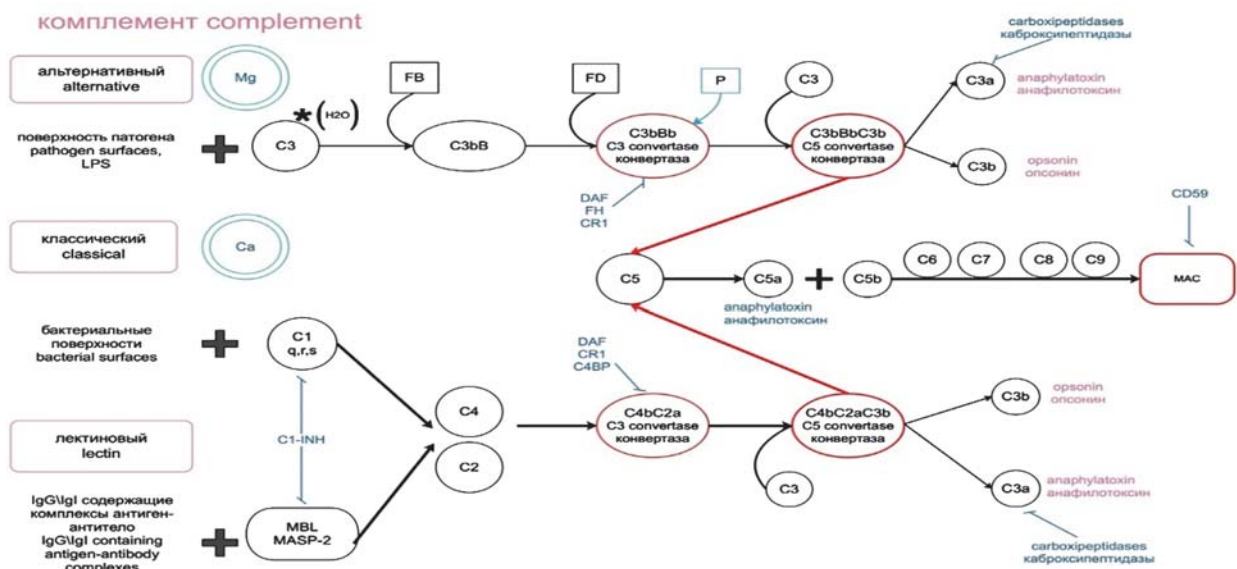


Рис. 1. Активация СК (цит. по [9] в модификации авторов)

Сокращения: LPS — липополисахариды, MBL — маннан-связывающий лектин; MASP — сериновые протеазы, MAC — мембраноатакующий комплекс; FB, FD, P — факторы альтернативного пути активации, DAF, FH, CR1, C4BP, CD59 — ингибиторы.

Fig. 1 Complement activation (cited [9] modified by the authors)

Abbreviations: LPS — lipopolysaccharides, MBL — mannan-binding lectin; MASP — serine proteases, MAC — membrane attack complex; FB, FD, P — factors of the alternative activation pathway, DAF, FH, CR1, C4BP, CD59 — inhibitors.

комплемент-опосредованный прунинг биохимически связан с механизмами, подобными апоптозу [17].

О вовлеченности СК в патогенез шизофрении свидетельствуют данные отечественных и зарубежных авторов. Согласно теории Файнберга (1983), причиной, лежащей в основе шизофрении, является нарушение процесса синаптического прунинга (избыточной обрезки дендритных шипиков) в подростковом возрасте [18, 19]. Дальнейшие исследования показали, что уменьшение объема мозга и толщины коры при шизофрении вызвано изменением морфологических особенностей нейропиля (включающего немиелинизированные аксоны, дендриты, глиальные клеточные отростки), что может привести к значительным изменениям корковых связей во взрослом возрасте и в конечном итоге к появлению характерных симптомов заболевания [20].

Генетические исследования показали корреляцию с аллелями, увеличивающими экспрессию C4a (продукт распада C4, анафилотоксин). Более высокая экспрессия C4a наблюдалась в образцах мозга пациентов с шизофренией по сравнению с контрольной группой, также была обнаружена положительная корреляция между числом копий C4 и сокращением нейропиля в различных областях мозга у пациентов, что свидетельствует о том, что повышенный уровень C4 может быть фактором риска возникновения или возобновления симптомов шизофрении.

Исследования сыворотки крови больных шизофренией [21] показали более выраженную активность классического пути комплемента у пациентов по сравнению с контролем, что подтверждается увеличенным количеством белков C1, C2, C3 и C4, и, соответственно, повышенным уровнем прикрепленного к иммунным комплексам C1q и повышенной экспрессией его рецептора CR1 на клетках крови.

Роль лектинового пути активации СК при шизофрении изучена недостаточно. Немногочисленные данные свидетельствуют о выявлении в сыворотке крови пациентов высокой активности MASP2 (маннан-связывающей лектинсериновой протеазы 2), связанной с MBL. Результаты исследований, отражающие активацию при шизофрении альтернативного пути СК, неоднозначны, что требует дальнейшего изучения.

Изучение особенностей активации системы комплемента при шизофрении представляет значительный интерес для понимания механизмов развития заболевания, оценки состояния больных и разработки новых диагностических и терапевтических подходов.

Ранее функциональную активность СК оценивали по гемолизу эритроцитов барана сывороткой крови больных. Используемые в настоящее время методы оценки СК ограничиваются определением количества отдельных компонентов системы в сыворотке крови. Результаты собственных исследований [22] убедительно свидетельствуют о том, что наименее изученный путь активации СК при шизофрении — альтернативный — можно оценивать с помощью биологических инструментов (модельных организмов).

Цель исследования: изучение особенностей работы СК у больных шизофренией путем сопоставления результатов оценки токсического действия сыворотки/плазмы на *Tetrahymena pyriformis* и иммуноферментного анализа, определяющего количественное содержание терминального комплекса комплемента в крови пациентов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в лаборатории нейробиологии и лаборатории клинической биохимии совместно с отделом эндогенных психических расстройств и аффективных состояний ФГБНУ «Научный центр психического здоровья».

В исследование включили 28 женщин в возрасте 16–40 лет (Me 20 (15,5–37)). Все пациентки были госпитализированы в клинику НЦПЗ с диагнозом параноидной шизофрении (F20 по МКБ-10) в стадии обострения и обследованы до начала психофармакотерапии. Общая длительность заболевания пациенток составила менее 5 лет.

Критерии включения в исследование:

- верифицированный диагноз шизофрении F20 по классификации МКБ-10;
- острое психотическое состояние;
- возраст 16–40 лет;
- женский пол;
- информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения:

- возраст пациенток моложе 16 и старше 40 лет;
- органическое поражение ЦНС, травмы головного мозга, тяжелые соматические заболевания в стадии декомпенсации, обострение воспалительных или инфекционных заболеваний, употребление психоактивных веществ.

В контрольную группу вошли 12 условно здоровых женщин соответствующего возраста, не состоящие на диспансерном учете и на момент включения в исследование не имеющие обострения хронических соматических заболеваний и признаков острых инфекций.

Этические аспекты

Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в программе. Проведение исследования выполнено с соблюдением современных этических норм и правил биомедицинских исследований, утвержденных Хельсинкским соглашением Всемирной медицинской ассоциации (в редакции 1975/2000 гг.) и одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦПЗ (протокол № 301 от 05.09.2016).

Ethical aspects

All examined participants of study signed the informed consent to take part in a study. The study carried out in compliance with modern ethical standards and rules of biomedical research approved by the Helsinki Agreement

of the World Medical Association (as amended 1975/2000) and was approved by the Local Ethics committee of FSBSI "Mental Health Research Centre" (protocol No. 301 from 05.09.2016).

Взятие крови для исследования проводили утром, натощак, в вакутейнеры с активатором свертывания (сыворотка) и напылением К3-ЭДТА (плазма).

Оценку функциональной активности СК (faCS) в крови осуществляли методом, основанным на реакции гибели инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в растворах сыворотки или плазмы крови [23], с помощью разработанного нами прибора БиоЛаТ [24] для циклического подсчета подвижных организмов и компьютерной программы обработки изображений AutoCiliata.

FaCS вычисляли по формуле: $faCS = 100 \cdot 1/T50$, где T50 — время гибели половины клеток *Tetrahymena pyriformis* (мин), концентрация сыворотки/плазмы 1,25%.

Оценку faCS проводили в плазме и сыворотке крови пациентов и контрольной группы с использованием четырех буферных растворов.

1. Буфер № 1 (0,3М ТРИС (pH = 7,5), 0,09М NaCl, 0,025 CaCl₂, 0,015М MgCl₂).

2. Буфер № 2 (0,3М ТРИС (pH = 7,5), 0,09М NaCl, 0,015М MgCl₂).

3. Буфер № 3 (0,3М ТРИС (pH = 7,5), 0,09М NaCl, 0,025 CaCl₂).

4. Буфер № 4 (0,3М ТРИС (pH = 7,5), 0,09М NaCl).

Количественное определение терминального комплекса комплемента (ТСС) в плазме крови проводили методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческой тест-системы ELISA KIT HK328 (Nucult Biotech, Голландия). Принцип метода основан на связывании антигенов с двумя видами мембрано-атакующего комплекса — мембранно-связанной формой МАК, образующейся в результате активации СК, и МАК, присутствующего в жидкой фазе [24]. В плазме здорового человека ТСС содержится в концентрации < 1 усл. ед./мл.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы Statistica 10. Оценка соответствия выборки закону нормального распределения проводилась путем расчета асимметрии, эксцесса и критерия Шапиро–Уилка (W) [25]. Несоответствие вероятности распределения величин нормальному закону послужило основанием для использования в работе непараметрических методов анализа, включающих определение медиан, 0,25 и 0,75 процентилей, а также применение непараметрического метода ранговых корреляций Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты исследования faCS и ТСС отдельно для пациентов и группы контроля представляют собой совокупности случайных величин, закон распределения вероятностей которых не является нормальным, так как они не удовлетворяют трем критериям:

асимметрии, эксцессу и критерию Шапиро–Уилка (W). Критерии нормальности распределения вероятностей [25] для группы пациентов: асимметрия $\leq 0,66$ (0,95), эксцесс $\leq 1,98$ ($p = 0,05$), $W \geq 0,924$ ($p = 0,05$). Критерии для группы контроля: асимметрия $\leq 0,91$ (0,95), эксцесс $\leq 1,64$ ($p = 0,05$), $W \geq 0,859$ ($p = 0,05$). В соответствии с двумя оценками выборки пациентов (28) и выборки лиц контрольной группы (12) вероятность распределения в этих выборках не подчиняется нормальному закону.

Результаты оценки faCS и определения ТСС в плазме крови пациентов с шизофренией и их сопоставление с результатами, полученными в контрольной группе, приведены в табл. 1.

В результате проведенного анализа показано, что различий между медианными значениями faCS в двух группах обследованных не выявлено, однако в группе пациентов наблюдались значительные колебания изучаемого показателя: у 25% пациентов faCS была выше нормы, а у 32% — ниже нормы. В группе контроля все значения faCS находились в пределах нормы.

Определение ТСС иммуноферментным методом выявило превышение медианного значения этого маркера у больных шизофренией в два раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). Следует отметить, что все значения ТСС в контрольной группе были ≤ 1 усл. ед./мл, т.е. соответствовали норме. Напротив, в группе пациентов значения показателей faCS и ТСС характеризовались большим разбросом (для faCS — от 1,87 до 12,99 мин, для ТСС — от 0,54 до 5,01 усл. ед./мл).

Подробный анализ полученных результатов показал, что у 9 больных (32,1%) показатели активности СК не отличались от контроля или умеренно сниженной faCS на фоне нормального уровня ТСС в плазме крови, т.е. характеризовались относительной сбалансированностью СК. У 7 пациентов (25%) faCS и концентрация ТСС в плазме были повышены, что свидетельствовало об излишней активации СК. У 12 человек (42,9%) наблюдалось разнонаправленное изменение уровней faCS и ТСС. Далее с использованием непараметрического метода ранговых корреляций Спирмена была проведена оценка взаимосвязи между faCS и ТСС в группе пациентов с шизофренией. Полученная величина коэффициента корреляции составила 0,32 ($p < 0,05$), что указывает на наличие слабой связи между изучаемыми параметрами.

Причина выявленной слабой связи между значениями faCS и ТСС может быть объяснена различиями определяемых параметров и может свидетельствовать лишь о частичной сопоставимости использованных методов. Иммуноферментным методом оценивается наличие суммарного количества терминального комплекса в крови обследованных, который включает, собственно, лизирующий клетки и растворенный МАК [26], не прикрепляющийся к мембране клеток и не запускающий их лизис. Метод определения faCS по времени гибели *Tetrahymena pyriformis* позволяет оценить

Таблица 1. Результаты определения faCS и TCC в крови пациентов с шизофренией и контрольной группы (Медиана; 25%; 75%)
Table 1 Results of determination of faCS and TCC in the blood of patients with schizophrenia and control group (Median; 25%; 75%)

Пациенты/Patients (n = 28)						Контроль/Control (n = 12)		
№	faCS, мин	TCC, усл. ед./мл	№	faCS, мин	TCC, усл. ед./мл	№	faCS, мин	TCC, усл. ед./мл
1	2,99	0,7	15	3,57	5,01	1	6,61	0,55
2	8,77	2,79	16	7,75	1,59	2	4,9	0,89
3	3,41	0,85	17	4,5	0,73	3	7,13	0,9
4	3,01	0,7	18	6,29	1,26	4	6,86	1,01
5	8,85	1,41	19	8,06	1,06	5	5,24	0,65
6	3,11	1,46	20	4,88	1,37	6	4,22	0,98
7	4,83	1,82	21	4,27	4,0	7	6,50	0,77
8	8,77	1,84	22	2,91	1,32	8	7,81	0,74
9	5,43	0,97	23	4,27	4,0	9	4,32	0,91
10	1,87	0,54	24	4,74	1,64	10	7,3	0,84
11	6,21	1,23	25	10,99	1,44	11	5,44	0,49
12	2,31	1,45	26	8,4	1,43	12	5,64	0,78
13	4,93	0,94	27	12,99	1,71			
14	4,63	1,66	28	4,48	0,897			
Медиана, %/ Median, %; 25–75				4,79 (3,49–7,91)	1,42 (0,96–1,68)	Медиана, %/ Median, %; 25–75		
						6,07 (5,07–7,0)		
						0,81 (0,7–0,91)		
p				0,247	< 0,001			

Примечание: статистически значимые различия с контролем ($p < 0,05$).
Note: statistically significant differences with control ($p < 0.05$).

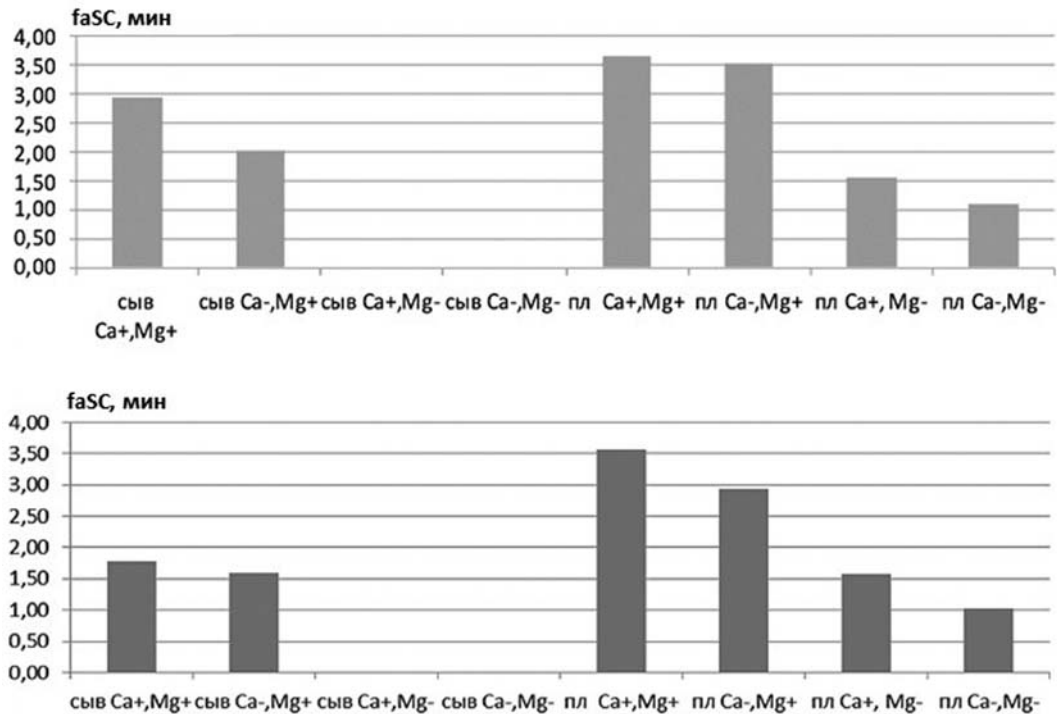


Рис. 2. Сравнение faCS в сыворотке и плазме крови здоровых испытуемых (а) и пациентов с шизофренией (б) с использованием буферных растворов с разным составом — буфер 1 (Ca^+ , Mg^+), буфер 2 (Ca^- , Mg^+), буфер 3 (Ca^+ , Mg^-), буфер 4 (Ca^- , Mg^-)
Fig. 2 Comparison of faCS in serum and blood plasma of healthy subjects (a) and schizophrenia patients (b) using buffer solutions with different compositions — buffer 1 (Ca^+ , Mg^+), buffer 2 (Ca^- , Mg^+), buffer 3 (Ca^+ , Mg^-), buffer 4 (Ca^- , Mg^-)

функциональную активность СК. Для уточнения роли СК у этих пациентов требуется проведение дальнейших исследований с использованием других методов и сопоставление с клиническими данными.

Поскольку образование МАК возможно при активации трех путей, то для уточнения метода оценки активности СК на *Tetrahymena pyriformis* был проведен опыт с буферами разного состава с концентрацией сыворотки/плазмы 1,25%, а именно с ионами Ca^+ и Mg^+ , без этих ионов Ca^- и Mg^- и в присутствии одного из ионов — $\text{Ca}^+/-$ или $\text{Mg}^+/-$. Полученные результаты приведены на рис. 2 (а, б).

Показано, что в сыворотке крови лиц контрольной группы разность между величиной faCS, определяемой с использованием буфера 1 (Ca^+ , Mg^+) и буфера 2 (Ca^- , Mg^+), составила около 0,9; а у пациентов с шизофренией — 0,2. Выявленные различия статистически значимы ($p < 0,05$) что, предположительно, указывает на наличие компонентов кальций-зависимого классического или лектинового пути. При этом, поскольку в отсутствии магния (буфер 3 (Ca^+ , Mg^-) и 4 (Ca^- , Mg^-)) сыворотка крови как больных, так и здоровых лиц была не токсична для инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, то стоит учитывать вклад магний-зависимого альтернативного пути активации СК.

В плазме крови картина была иной. Во-первых, уровни faCS плазмы со всеми вариантами буфера были значимо выше, чем в сыворотке ($p < 0,05$), а во-вторых, без магния (буфер 3 и 4) уровень faCS был не нулевым, как в сыворотке, что, вероятно, определяется вкладом в активацию СК компонентов коагуляции. Допустимо, что при использовании в эксперименте раствора плазмы крови происходит активация обоих каскадов — и СК, и коагуляции.

Таким образом, результаты проведенного эксперимента показывают, что активация СК при внесении инфузорий в раствор сыворотки или плазмы крови происходит по альтернативному механизму, так как удовлетворяются оба условия: наличие ионов магния и отсутствие антител для активации классического или лектинового пути. Кроме того, уровень faCS в растворах плазмы дополнительно определяется взаимодействием компонентов каскадных процессов коагуляции и СК, поэтому исследование faCS целесообразно проводить в плазме крови, а не в сыворотке, так как полученный результат более адекватно отражает состояние системы комплемента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование указывает на участие СК в патогенезе шизофрении, в том числе акцентирует малоисследованный вклад альтернативного пути активации СК.

Сопоставление двух методов работы СК: оценки функциональной активности с использованием биологических объектов инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и иммуноферментного анализа определения ТСС

показало, что эти методы могут быть взаимодополняющими и позволяют оценить участие различных механизмов активации и белков СК в крови.

Метод на инфузориях позволяет выявить индивидуальные критические значения функциональной активности СК, а иммуноферментный метод позволяет дополнительно к другим маркерам устанавливать принадлежность респондента к группе больных шизофренией.

С использованием иммуноферментного метода выявлено, что медиана значений ТСС в группе пациентов в два раза превышала этот параметр в группе контроля.

Второй метод исследования показал, что различий между медианными значениями faCS в двух группах выявлено не было. При этом faCS в плазме пациентов характеризуется значительными колебаниями: у 25% обследованных показатели находились выше нормы, у 32% — ниже. В группе контроля все значения faCS находились в пределах нормы.

Предположительно, данные о повышении обоих показателей в крови пациентов могут служить критерием для использования в комплексной терапии таких больных противовоспалительных препаратов, уменьшающих образование терминального комплекса СК [27].

Варьирование солевого состава среды инкубации показало активацию СК по альтернативному пути, таким образом, метод оценки функциональной активности СК на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* позволяет оценить наименее исследованный в патогенезе шизофрении альтернативный путь активации СК.

Однако для лучшего понимания роли и путей активации СК в патогенезе шизофрении необходимо более тщательное изучение этих вопросов с проведением дополнительных исследований, включающих клиническую оценку состояния больных.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ/REFERENCES

1. Inglis JE, Radziwon KA, Maniero GD. The serum complement system: a simplified laboratory exercise to measure the activity of an important component of the immune system. *Adv Physiol Educ.* 2008;32(4):317–321. doi: 10.1152/advan.00061.2007
2. Markiewski M, Lambris J. The Role of Complement in Inflammatory Diseases. *Am J Pathol.* 2007;171(3):715–727. doi: 10.2353/ajpath.2007.070166
3. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris J, Huber-Lang M. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:71–79. doi: 10.1007/978-0-387-78952-1_6
4. Bossi F, Peerschke E, Ghebrehiwet B, Tedesco F. Crosstalk between the complement and the kinin system in vascular permeability. *Immunol Lett.* 2011;140(1–2):7–13. doi: 10.1016/j.imlet.2011.06.006
5. Bekassy Z, Lopatko Fagerström I, Bader M, Karpman D. Crosstalk between the renin–angiotensin,

- complement and kallikrein–kinin systems in inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2022;22(7):411–428. doi: 10.1038/s41577-021-00634-8
6. Ghebrehwet B, Peerschke E. Complement and coagulation: key triggers of COVID-19-induced multiorgan pathology. *J Clin Invest*. 2020;130(11):5674–5676. doi: 10.1172/JCI142780
 7. Merle N, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I — molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol*. 2015;02:6262. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262
 8. Ключник ТП. Воспаление как универсальный патофизиологический механизм хронических неинфекционных заболеваний. *Психиатрия*. 2023;21(5):7–16. doi: 10.30629/2618-6667-2023-21-5-7-16
Klyushnik TP. Inflammation as a Universal Pathophysiological Mechanism of Chronic Non-Communicable Diseases. *Psychiatry (Moscow) (Psikhiatriya)*. 2023;21(5):7–16. (In Russ.) doi: 10.30629/2618-6667-2023-21-5-7-16
 9. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011;343:227–235. doi: 10.1007/s00441-010-1034-0
 10. Bohlson S, Tenner A. Annual Review of Immunology Complement in the Brain: Contributions to Neuroprotection, Neuronal Plasticity, and Neuroinflammation. *Annu Rev Immunol*. 2023;41:431–452. doi: 10.1146/annurev-immunol-101921-035639
 11. Morgan BP. Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol*. 2018;40(1):113–124. doi: 10.1007/s00281-017-0662-9
 12. Loeffler DA, Camp DM, Conant SB. Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study. *J Neuroinflammation*. 2006 Oct 19;3:29. doi: 10.1186/1742-2094-3-29. PMID: 17052351; PMCID: PMC1626447.
 13. Druart M, Le Magueresse C. Emerging Roles of Complement in Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. 2019 Aug 21;10:573. doi: 10.3389/fpsy.2019.00573. PMID: 31496960; PMCID: PMC6712161.
 14. Черемных ЕГ, Иванов ПА, Фактор МИ, Чикина ЕЮ, Никитина СГ, Симашкова НВ, Брусов ОС. Система комплемента как маркер иммунной дисфункции у детей с расстройством аутистического спектра. *Медицинская иммунология*. 2019;21(4):773–780. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-773-780
Cheremnykh EG, Ivanov PA, Factor MI, Chikina EY., Nikitina SG, Simashkova NV, Brusov OS. The complement system as a marker of immune dysfunction in children with autism spectrum disorder. *Medical immunology*. 2019;21(4):773–780. (In Russ.). doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-773-780
 15. Persson M, Pekna M, Hansson E, Rönnbäck L, Neurosci E. The complement-derived anaphylatoxin C5a increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake in a TNF-alpha-independent manner. *Eur J Neurosci*. 2009;29(2):267–274. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06575.x
 16. Cardozo P, Lima I, Maciel E, Silva N, Dobranskyb T, Ribeiro F. Synaptic Elimination in Neurological Disorders. *Curr Neuroparmacol*. 2019;17:1071–1095. doi: 10.2174/1570159X17666190603170511
 17. Rice DS, Barone J. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect*. 2000;108:511–533. doi: 10.1289/ehp.00108s3511
 18. Wang M, Zhang L, Gage F. Microglia, complement and schizophrenia. *Nat Neurosci*. 2019;22(3):333–334. doi: 10.1038/s41593-019-0343-1
 19. Keshavan M, Lizano P, Prasad K. The synaptic pruning hypothesis of schizophrenia: promises and challenges. *World Psychiatry*. 2022;19(1):110–111. doi: 10.1002/wps.20725
 20. Cardozo P, Lima IB, Maciel E, Silva N, Dobransky T, Ribeiro F. Synaptic Elimination in Neurological Disorders. *Curr Neuroparmacol*. 2019;17(11):1071–1095. doi: 10.2174/1570159X17666190603170511
 21. Magdalon J, Mansur F, Teles e Silva A, Abreu de Goes V, Reiner O, Laurato Sertié A. Complement System in Brain Architecture and Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci*. 2020 Feb 5;14:23. doi: 10.3389/fnins.2020.00023
 22. Черемных ЕГ, Иванов ПА, Фактор МИ, Карпова НС, Васильева ЕФ, Гусев КВ, Брусов ОС. Новый метод оценки функциональной активности системы комплемента. *Медицинская иммунология*. 2015;17(5):479–488. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488
Cheremnykh EG, Ivanov PA, Factor MI, Karpova NS, Vasilyeva EF, Gusev KV, Brusov OS. A new method to assess the functional activity of serum complement system. *Medical Immunology*. 2015;17(5):479–488. (In Russ.). doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488
 23. Иванов ПА, Фактор МИ, Карпова НС, Черемных ЕГ, Брусов ОС. Комплемент-опосредованная гибель инфузорий *Tetrahymena pyriformis* под воздействием сыворотки крови человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;160(12):739–743.
Ivanov PA, Factor MI, Karpova NS, Cheremnykh EG, Brusov OS. Complement-mediated death of the ciliates *Tetrahymena pyriformis* under the influence of human blood serum. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015;160(12):739–743. (In Russ.).
 24. Черемных ЕГ, Покатаев АС, Гридунова ВН. Прибор для биологических исследований. *Патент RU*. 2361913C2. 2009;20.
Cheremnykh EG, Pokataev AS, Gridunova VN. Device for biological research. *Patent RU*. 2361913C2. 2009;20. (In Russ.).
 25. Royston TP. Approximating the Shapiro-Wilk W-Test for non-normality. *Statistics and Computing*. 1992;10:11:585108. doi: 10.3389/fimmu.2020.585108
 26. Barnum SR, Bubeck D, Schein TN. Soluble Membrane Attack Complex: Biochemistry and Immunobiology.

Front Immunol. 2020 Nov 10;11:585108. doi: 10.3389/fimmu.2020.585108. PMID: 33240274; PMCID: PMC7683570.

27. Harder MJ, Kuhn N, Schrezenmeier H, Höchsmann B, von Zabern I, Weinstock C, Simmet T, Ricklin D, Lambris JD, Skerra A, Anliker M, Schmidt CQ. Incomplete

inhibition by eculizumab: mechanistic evidence for residual C5 activity during strong complement activation. *Blood.* 2017 Feb 23;129(8):970–980. doi: 10.1182/blood-2016-08-732800. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28028023; PMCID: PMC5324716.

Сведения об авторах

Анастасия Николаевна Позднякова, младший научный сотрудник, лаборатория нейроиммунологии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9137-0167>
fanianastya@gmail.com

Ирина Николаевна Отман, кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатория нейроиммунологии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3745-8413>
irinaot@mail.ru

Светлана Александровна Зозуля, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория нейроиммунологии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5390-6007>
s.ermakova@mail.ru

Наталья Всеволодовна Кост, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория нейроиммунологии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1118-1137>
nat-kost@yandex.ru

Елена Григорьевна Черемных, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, лаборатория клинической биохимии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5166-4462>
elcher10@yandex.ru

Information about the authors

Anastasia N. Pozdnyakova, Junior Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, FSBSI “Mental Health Research Centre”, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9137-0167>
fanianastya@gmail.com

Irina N. Otman, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, FSBSI “Mental Health Research Centre”, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3745-8413>
irinaot@mail.ru

Svetlana A. Zozulya, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, FSBSI “Mental Health Research Centre”, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5390-6007>
s.ermakova@mail.ru

Natalya V. Kost, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Neuroimmunology, FSBSI “Mental Health Research Centre”, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1118-1137>
nat-kost@yandex.ru

Elena G. Cheremnykh, Cand. Sci. (Tech.), Senior Researcher, Laboratory of Biochemistry, FSBSI “Mental Health Research Centre”, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5166-4462>
elcher10@yandex.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare about no conflict of interests.

Дата поступления 18.03.2024
Received 18.03.2024

Дата рецензирования 30.08.2024
Revised 30.08.2024

Дата принятия к публикации 24.09.2024
Accepted for publication 24.09.2024