

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 612-083:616-097:616.94

## АВИДНОСТЬ И КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ НАТИВНЫХ И ХАОТРОПНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С ПРОТЕИНОВЫМИ И ГЛИКОЛИПИДНЫМИ АНТИГЕНАМИ

*Н. В. ХИМИЧ, А. И. ГОРДИЕНКО*

*ГУ «Крымский государственный медицинский университет  
им. С. И. Георгиевского», Симферополь, Украина;  
e-mail: uu4jey@csmu.strace.net*

*Установлено, что нативные и хаотропно модифицированные иммуноглобулины существенно отличаются по авидности и характеру конкурентного ингибирования связывания с протеиновыми (овальбумин), гликолипидными (липополисахариды) антигенами и нативной двунитовой ДНК. По-видимому, это связано со структурно-функциональными различиями их антигенсвязывающих центров.*

*Ключевые слова: полиреактивные иммуноглобулины, нативные IgG-антитела, липополисахариды, авидность, конкурентное ингибирование связывания антител.*

**И**звестно, что в сыворотке крови здоровых людей всегда содержится некоторое количество иммуноглобулинов (ИГ), обладающих способностью к низкоавидному связыванию с самыми разными биологическими молекулами. Считается, что такие антитела, получившие название «естественных», или «натуральных», служат первичным защитным барьером по отношению к инфекционным агентам в индуктивный период специфического иммунного ответа [1, 2]. Наряду с этим показано, что воздействие на сыворотку крови или ее иммуноглобулиновую фракцию (нативные IgG-антитела) различных физико-химических факторов (экстремально низкие либо высокие значения pH, обработка липазами, 4–10 М раствором тиоцианата калия, органическими растворителями, действие активных форм кислорода и др.) может приводить к полиреактивной трансформации иммуноглобулинов, что проявляется в многократном усилении их взаимодействия с широким спектром самых разных антигенов [2–9]. Предполагается, что такая трансформация нативных IgG-антител в полиреактивные иммуноглобулины (ПРИГ) может быть связана с определенными нарушениями упорядоченной структуры протеиновой молекулы вследствие ослабления гидрофобных связей между доме-

нами легких и тяжелых цепей, что, в свою очередь, ведет к увеличению глубины и ширины антигенсвязывающей области и обнажению новых потенциальных участков взаимодействия с различными антигенными детерминантами. В результате антитела становятся полиреактивными [3, 10, 11].

На сегодняшний день остается неясным, являются ли хаотропно модифицированные ИГ функционально идентичными нативным полиреактивным антителам или же это разные по свойствам (а, возможно, и биологическим функциям) молекулы. К тому же имеются данные о том, что содержащиеся в сыворотке животных и человека нативные полиреактивные ИГ в значительной степени заблокированы антигенами и их разблокирование приводит к заметному усилению реактивности таких антител [3, 10, 12, 13]. Одной из наиболее важных характеристик реакции взаимодействия ИГ с антигенными детерминантами поливалентного антигена является авидность (функциональная аффинность) антител [14]. В связи с этим возникает вопрос: насколько существенными могут быть различия в авидности между нативными антителами и ПРИГ? Рассмотрению некоторых аспектов этого вопроса посвящены исследования, результаты которых представлены в настоящей статье.

## Материалы и методы

При проведении экспериментов использовали пул-плазму крови 40 доноров Крымской республиканской станции переливания крови (г. Симферополь), полученную общепринятым способом и хранившуюся при +4–8 °С в присутствии 0,1% азида натрия.

Имуноглобулиновую фракцию (нативные IgG-антитела) выделяли четырехкратным осаждением 40%-ым раствором сульфата аммония. Полученные нативные IgG-антитела трансформировали в ПРИГ кратковременной обработкой 3,5 М раствором тиоцианата калия [7]. Концентрацию протеина в препаратах нативных IgG-антител и ПРИГ определяли биуретовым методом [15]. Во время всего периода проведения экспериментов ПРИГ хранили при +4–8 °С в присутствии 0,1%-го азида натрия.

Анализ конкурентного ингибирования связывания нативных IgG-антител и ПРИГ с протеиновыми (овальбумин; Sigma Chem. Co., США) и гликолипидными антигенами – коммерческие препараты липополисахаридов энтеробактерий *Escherichia coli* K235, *Salmonella minnesota*, *Salmonella enteritidis* (Sigma Chem. Co., США) и липополисахариды *Escherichia coli* K30 и *Escherichia coli* K12, выделенные из бактериальной биомассы методом водно-фенольной экстракции и дополнительно очищенные от примесей РНК обработкой цетавлоном (Serva, Германия) [16], а также с нативной двунитевой ДНК из эритроцитов цыплят (ds-ДНК; Reanal, Венгрия) проводили методом твердофазного иммуноэнзимного анализа (тИЭА) [17]. Особенности проведения этих экспериментов приведены в разделе «Результаты и обсуждение».

Авидность ИГ определяли методом тИЭА, элюируя адсорбировавшиеся на иммуносорбенте нативные IgG-антитела или ПРИГ возрастающими концентрациями (от 0 до 7 М) тиоцианата аммония. При этом индекс авидности соответствует молярной концентрации тиоцианата аммония, вызывающей 50%-е уменьшение абсорбции конечного продукта энзиматической реакции на заключительном этапе тИЭА [18].

Все эксперименты проводили в 3-кратной повторности. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel 97 из пакета Microsoft Office 97. Каждая точка кривых на рисунках, приведенных в разделе «Результаты и обсуждение», представляет собой среднее значение, полученное из трех параллельных опытов. При этом относительная величина стандартной

ошибки не превышает 7% от среднего значения измеряемого показателя.

## Результаты и обсуждение

Как уже отмечалось выше, важнейшей функциональной характеристикой любых антител является авидность, под которой подразумевают суммарную энергию взаимодействия антигенсвязывающих центров молекулы антитела с антигенными детерминантами поливалентного антигена [14]. В нашем распоряжении находились сыворотки крови 50 больных с абдоминальной хирургической патологией, в которых предварительным скринингом был обнаружен высокий уровень антител класса G, специфичных к липополисахариду *E. coli* K235 (анти-ЛПС-IgG). Представлялось интересным сравнить авидность анти-ЛПС-IgG и ПРИГ по отношению к одному и тому же антигену – ЛПС *E. coli* K235.

Для определения индекса авидности был использован метод элюции тиоцианатом аммония [18]. Оказалось, что по величине индекса авидности анти-ЛПС-IgG обследованные сыворотки крови можно разделить на две группы: содержащие низкоавидные анти-ЛПС-IgG ( $n = 5$ , средний индекс авидности равен  $1,65 \pm 0,02$ ) и содержащие высокоавидные анти-ЛПС-IgG ( $n = 45$ , средний индекс авидности равен  $2,51 \pm 0,08$ ). Индекс авидности ПРИГ по отношению к ЛПС *E. coli* K235 ( $1,48 \pm 0,01$ ) статистически достоверно ниже величины данного показателя для низкоавидных и высокоавидных анти-ЛПС-IgG соответственно на 10,3% ( $P < 0,01$ ) и 41,0% ( $P < 0,001$ ). В то же время кривая элюции ПРИГ возрастающими концентрациями тиоцианата аммония существенно отличается от кривых элюции низко- и высокоавидных анти-ЛПС-IgG наличием четко выраженного «плато» в диапазоне концентраций тиоцианата аммония от 4 до 7 М, наличие которого, по-видимому, обусловлено необратимым связыванием определенной части ПРИГ с иммобилизованным на поверхности твердой фазы ЛПС *E. coli* K235 (рис. 1). Аналогичная картина наблюдается и в экспериментах по изучению связывания ПРИГ с ЛПС *E. coli* K12, *S. minnesota* и *S. enteritidis* (рис. 2): в данном случае некоторая часть ПРИГ практически необратимо взаимодействует с иммобилизованными на твердой фазе ЛПС *E. coli* K12, ЛПС *S. minnesota* и *S. enteritidis*. Вместе с тем кривая элюции ПРИГ возрастающими концентрациями тиоцианата аммония овальбумина (ОВА) сходна с

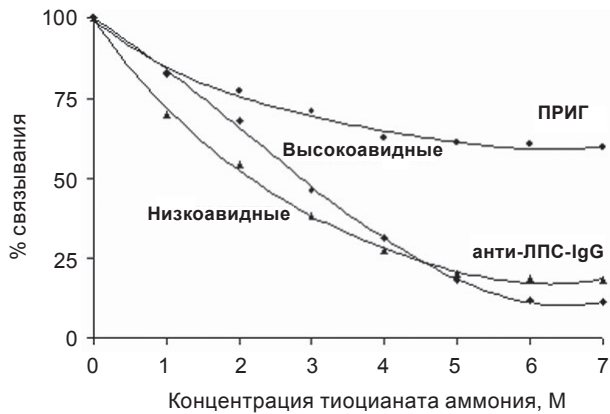


Рис. 1. Кривые элюции тиоцианатом аммония полиреактивно трансформированных иммуноглобулинов и анти-ЛПС-IgG после их связывания с ЛПС *E. coli* K235

кривыми элюции для нативных анти-ЛПС-IgG. При этом индекс авидности ПРИГ по отношению к ЛПС *E. coli* K12, ЛПС *S. enteritidis*, ЛПС *S. minnesota* и ОВА в среднем равняется соответственно  $1,87 \pm 0,02$ ;  $2,07 \pm 0,03$ ;  $1,93 \pm 0,02$  и  $1,89 \pm 0,01$ .

Как известно, авидность антител существенно влияет на характер взаимодействия ИГ с различными антигенными эпитопами [14, 18]. В связи с этим нами была проведена серия экспериментов по конкурентному ингибированию связывания протеиновыми и гликолипидными антигенами, а также с ds-ДНК нативными IgG-антителами и полученных из них ПРИГ с иммобилизованным ЛПС *E. coli* K235. При проведении данного эксперимента ЛПС *E. coli* K235 (10 мкг/мл) иммобилизовали в течение 12 часов при 18–20 °С на поверхности полистироловых планшетов [17]. Для удаления неспецифически связавшихся компонентов и блокирования свободных центров связывания лунки промывали 0,01 М фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,05%-й Твин 20 (PBS-Т). Затем в лунки последовательно вносили смесь нативных IgG-антител или ПРИГ (0,063 мг/мл) и соответствующего ингибирующего антигена (ЛПС *E. coli* K235 или *E. coli* K30, *E. coli* K12, *S. minnesota*, *S. enteritidis*, а также ОВА, ds-ДНК) с начальной концентрацией 100 мкг/мл (разводили с 2-кратным шагом PBS-Т) и конъюгата козьих аффинноочищенных антител к IgG человека с пероксидазой хрена (1 : 4000). С каждым реагентом проводили 60-минутную инкубацию при 37 °С. Оценку ассоциированной с твердой фазой пероксидазной активности осуществляли как описано в работе [17].

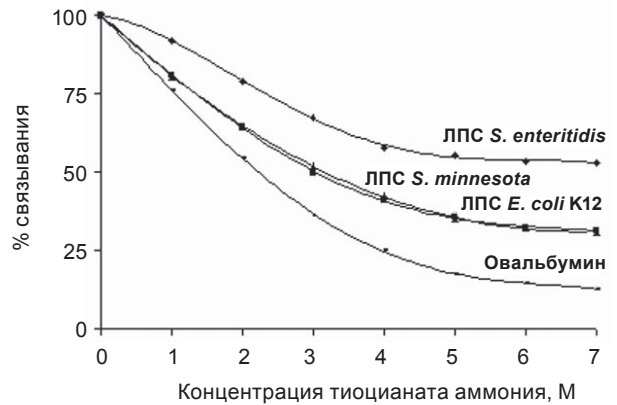


Рис. 2. Кривые элюции тиоцианатом аммония полиреактивно трансформированных иммуноглобулинов после их связывания с ЛПС *E. coli* K12, *S. minnesota*, *S. enteritidis* и овальбумином

Полученные результаты конкурентного ингибирования связывания нативных IgG-антител и ПРИГ с ЛПС *E. coli* K235, *E. coli* K30, *E. coli* K12, *S. minnesota*, *S. enteritidis*, а также ОВА и ds-ДНК выражали в процентах, при этом за 100% принимали уровень связывания антител при минимальной концентрации конкурирующего антигена.

Установлено, что присутствующие в растворе вышеуказанные антигены в разной степени влияют на взаимодействие ПРИГ (рис. 3) и нативных IgG-антител (рис. 4) с ЛПС *E. coli* K235, иммобилизованном на поверхности твердой фазы. Так, при максимальной кон-

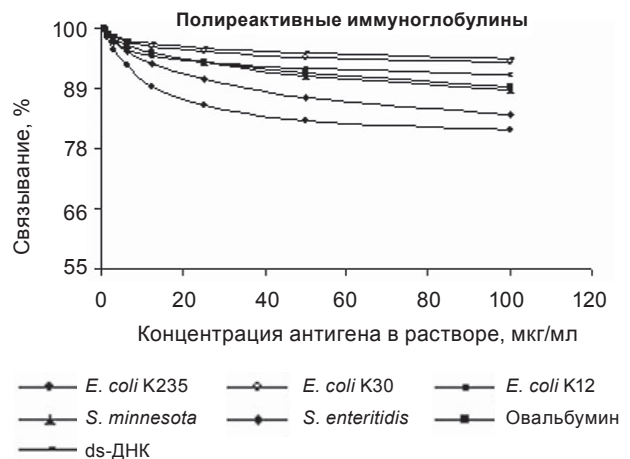


Рис. 3. Влияние ЛПС *E. coli* K235, ЛПС *E. coli* K30, ЛПС *E. coli* K12, ЛПС *S. minnesota*, ЛПС *S. enteritidis*, овальбумина и нативной динитробензильной ДНК на связывание полиреактивно трансформированных иммуноглобулинов с иммобилизованным ЛПС *E. coli* K235

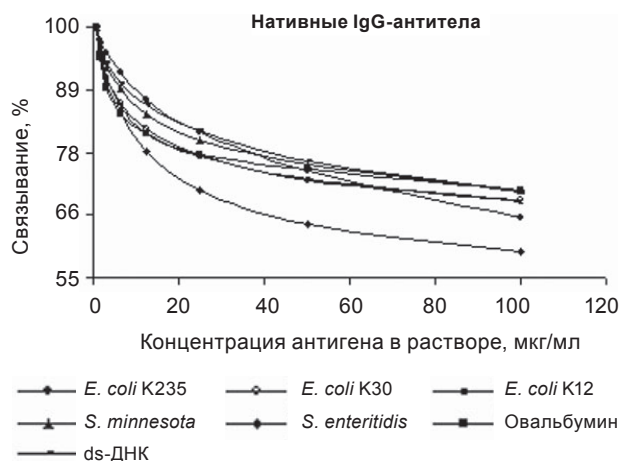


Рис. 4. Влияние ЛПС *E. coli* K235, ЛПС *E. coli* K30, ЛПС *E. coli* K12, ЛПС *S. minnesota*, ЛПС *S. enteritidis*, овальбумина и нативной двунитовой ДНК на связывание нативных IgG-антител с иммобилизованным ЛПС *E. coli* K235

центрации (100 мкг/мл) в растворе ЛПС *E. coli* K235, *E. coli* K30, *E. coli* K12, *S. minnesota*, *S. enteritidis*, а также ОВА и ds-ДНК ингибирование связывания ПРИГ с иммобилизованным ЛПС *E. coli* K235 значительно меньше, чем для нативных IgG-антител (рис. 5). В соответствии с полученными нами данными, даже при достаточно высокой концентрации указанные антигены не оказывают существенного влияния на связывание ПРИГ с иммобилизованным ЛПС *E. coli* K235. По всей видимости, это определяется тем, что авидность ПРИГ к солюбилизованным антигенам существенно ниже, чем к антигену, иммобилизованному на поверхности твердой фазы.

Таким образом, нативные IgG-антитела и ПРИГ, полученные путем хаотропного модифицирования нативной иммуноглобулиновой фракции, существенно отличаются по авидности и характеру конкурентного ингибирования связывания с ЛПС энтеробактерий, ОВА и ds-ДНК. По-видимому, в первую очередь это связано со структурно-функциональными различиями антигенсвязывающих центров нативных IgG-антител и ПРИГ.



Рис. 5. Графический анализ конкурентного ингибирования связывания полиреактивно трансформированных иммуноглобулинов и нативных IgG-антител с ЛПС *E. coli* K235, ЛПС *E. coli* K30, *E. coli* K12, *S. minnesota*, *S. enteritidis*, а также с овальбумином и нативной двунитовой ДНК

#### АВІДНІСТЬ ТА КОНКУРЕНТНЕ ІНГІБУВАННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ НАТИВНИХ ТА ХАОТРОПНО МОДИФІКОВАНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ІЗ ПРОТЕЇНОВИМИ ТА ГЛІКОЛІПІДНИМИ АНТИГЕНАМИ

Н. В. Хіміч, А. І. Гордієнко

ДУ «Кримський державний медичний університет ім. С. І. Георгієвського», Сімферополь, Україна;  
e-mail: uu4jey@csmu.strace.net

Встановлено, що нативні та хаотропно модифіковані імуноглобуліни суттєво відрізняються авідністю та характером конкурентного інгібування зв'язування з протеїновими (овальбумін), гліколіпідними (ліпополісахариди) антигенами та нативною двонитковою ДНК. Можливо, це пов'язано зі структурно-функціональними відмінностями їхніх антигензв'язувальних центрів.

**Ключові слова:** поліреактивні імуноглобуліни, нативні антитіла, ліпополісахариди, авідність, конкурентне інгібування зв'язування антитіл.



**AVIDITY AND COMPETITIVE  
INHIBITION OF BINDING NATIVE  
AND CHAOTROPICALLY MODIFIED  
IMMUNOGLOBULINS WITH PROTEIN  
AND GLYCOLIPID ANTIGENS**

*N. V. Khimich, A. I. Gordienko*

State Institution S. I. Georgievsky Crimea State  
Medical University, Simferopol, Ukraine;  
e-mail: uu4jey@csmu.strace.net

**S u m m a r y**

It is established, that native and chaotropically modified immunoglobulins essentially differ by avidity and character of competitive inhibition of binding with protein (ovalbumin), glycolipid (lipopolysaccharides) antigens and native double-string DNA. Apparently, it is connected with structural and functional distinctions of their antigen-binding centres.

**Key words:** polyreactive immunoglobulins, native antibody, lipopolysaccharides, avidity, competitive inhibition of binding with antibodies.

1. *Cheng H. M.* // *Autoimmunity.* – 1998. – **27**, N 2. – P. 99–108.
2. *Bouvet J. P., Dighiero G.* // *Infect. Immun.* – 1998. – **66**, N 1. – P. 1–4.
3. *Бобровник С. А., Лященко К. П., Комиссаренко С. В.* // Докл. АН УССР. – 1990. – № 6. – С. 71–75.
4. *Бобровник С. А., Маринетс А. В.* // Укр. біохім. журн. – 1993. – **65**, № 2. – С. 21–26.
5. *Бобровник С. А.* // Там само. – 2002. – **74**, № 3. – С. 133–141.
6. *Бобровник С. А.* // Там само. – № 5. – С. 49–54.
7. *Гордиенко А. И., Химич Н. В.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 6. – С. 78–85.
8. *Малинка М. К., Петруев В. М., Подгородниченко В. К.* // *Иммунология.* – 2007. – № 1. – С. 16–19.
9. *Bouvet J. P., Dighiero G.* // *J. Immunol. Methods.* – 2001. – **254**, N 1–2. – P. 199–201.
10. *Бобровник С. А.* // Укр. біохім. журн. – 1990. – **62**, № 5. – С. 86–89.
11. *Бобровник С. А.* // Там само. – 2002. – **74**, № 2. – С. 37–44.
12. *Бобровник С. А., Маргутич В. М., Климашевский В. М. и др.* // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 1. – С. 65–72.
13. *Sigounas G., Kolaitis N., Monell-Torrens E., Notkins A. L.* // *J. Clin. Immunol.* – 1994. – **14**, N 6. – P. 375–381.
14. *Структура и функции антител /* Под ред. Л. Глинна, М. Стьюарда. – М.: Мир. – 1983. – 200 с.
15. *Yatzidis H.* // *Clin Chem.* – 1977. – **23**, N 5. – P. 908.
16. *Вестфаль О., Янн К.* *Методы химии углеводов.* – М.: Мир, 1967. – С. 325–332.
17. *Гордиенко А. И.* // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 6. – С. 130–135.
18. *Pullen G. R., Fitzgerald M. G., Hosking C. S.* // *J. Immunol. Methods.* – 1986. – **86**, N 1. – P. 83–87.

Получено 27.02.2012