

ОГЛЯДИ

УДК 612.017.1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИРЕАКТИВНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

С. А. БОБРОВНИК, М. А. ДЕМЧЕНКО, С. В. КОМИСАРЕНКО

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Неизвестный ранее феномен приобретённой полиреактивности сывороточных иммуноглобулинов, которые были подвергнуты воздействию концентрированных растворов хаотропных ионов, таких как KSCN (3,0–5,0 М), а также низких/высоких рН (рН 2,2–3,0/рН 11,0–12,0) или же нагреванию до 58–60 °С, был впервые описан нами в 1990 г. Значительно позже (одиннадцать лет спустя) сходные данные были опубликованы и J. P. Vouvet с соавтр. (2001), которые полностью подтвердили наши результаты относительно влияния хаотропных ионов или резкого сдвига рН на усиление полиреактивных свойств сывороточных иммуноглобулинов. Наши исследования (1993, 1995, 1998 г.) свойств полиреактивных иммуноглобулинов (ПРИГ) показали, что механизм их неспецифического взаимодействия с антигенами значительно отличается от механизма связывания специфических антител с соответствующими антигенами. Позже нами было показано, что повышение активности ПРИГ может быть индуцировано *in vivo* (1999 г.), а также, что ПРИГ являются одним из компонентов интактных сывороток человека и животных, а значит, не исключено, что они могут выполнять определённые биологические функции. Исследование влияния ПРИГ на такие процессы, как фагоцитоз микробов или же развитие злокачественных опухолей (S. A. Bobrovnik с соавтр., 1995, 1998) указывает на то, что ПРИГ могут играть определённую роль в защите организма от инфекций или при развитии различных патологических процессов. Недавно нами было также установлено (С. А. Бобровник с соавтр., 2014), что с возрастом концентрация сывороточных IgG ПРИГ человека существенно возрастает. Эти данные указывают на важность дальнейших исследований иммунохимических свойств ПРИГ и их биологической роли в развитии разнообразных заболеваний.

Ключевые слова: полиреактивные иммуноглобулины, натуральные антитела, антигены, специфичность, аффинность, авидность.

Обнаружение полиреактивных иммуноглобулинов

Впервые феномен полиреактивности иммуноглобулинов был обнаружен нами при изучении содержания иммунных комплексов в сыворотках животных. Было установлено, что иммуноглобулины сывороток животных, обработанные растворами хаотропных солей (3,0–5,0 М раствором KSCN) или подкисленные до рН 2,0–2,5 с целью диссоциации предполагаемых иммунных комплексов, приобретают способность в несколько раз сильнее связываться с разнообразными антигенами, чем исходные иммуноглобулины сывороток [1, 2]. Поскольку целью обработки сывороток раствором KSCN или

подкисления их до рН 2,0–2,5 было разрушение предполагаемых иммунных комплексов, то обнаруженное усиление реактивности сывороток после подобных обработок казалось весьма логичным и связанным с диссоциацией иммунных комплексов, т.е. с разблокированием имеющихся в сыворотке антител, которые были заблокированы антигеном.

Однако вскоре нами было установлено, что предварительное удаление иммунных комплексов из сывороток (с помощью их осаждения полиэтиленгликолем) практически не влияет на их способность «активироваться» под влиянием указанных воздействий. Более того, подобными свойствами «активироваться» обладали не

только сыворотки человека и животных, но и выделенные из них иммуноглобулиновые фракции (рис. 1), которые, казалось, почти не содержат иммунных комплексов [1, 2]. К подобной «активации» приводило также подкисление (до pH 2,0–3,0) или подщелачивание (до pH 11,0–12,0), а также прогревание сывороток в течение 10–20 мин при 58–60 °С. Стало ясно, что в данном случае мы имеем дело с феноменом, который ранее не был описан в литературе.

Чрезвычайно интересным и непонятным для нас в то время был тот факт, что «активированные» указанным способом образцы антител практически не обладали специфичностью и были способны примерно одинаково реагировать с самыми разнообразными антигенами, серологически явно неродственными. В связи с этим в первых наших работах мы называли эти антитела «полиспецифичными». Позднее «активированные» подобным образом иммуноглобулины, а затем и обработанные сходным образом моноклональные антитела, потерявшие свою специфичность, были названы нами полиреактивными иммуноглобулинами (ПРИГ). Первоначально причина обнаруженной «полиспецифичности» ПРИГ была неясной и могла быть объяснена двумя различными способами:

а) Исследуемые образцы «активированных» сывороток содержат большое количество разнообразных антител и благодаря этому способны реагировать с различными антигенами.

б) Каждая из молекул «активированных» ПРИГ обладает способностью неспецифически связываться с разнообразными, серологически неродственными антигенами.

Решить эту проблему нам удалось уже в самом начале исследований [1, 2] следующим способом. Были поставлены опыты, в которых изучали способность полиспецифичных образцов антител не только связываться с сорбированными на плашках антигенами, но и быть ингибированными растворимыми антигенами, как теми же, что иммобилизованы на плашке, так и серологически неродственными антигенами. Поскольку связывание ПРИГ с иммобилизованным на плашке антигеном можно было примерно с одинаковой эффективностью заблокировать различными растворимыми антигенами, причем как серологически родственными, так и неродственными к иммобилизованному антигену, то стало очевидным, что ПРИГ не состоят

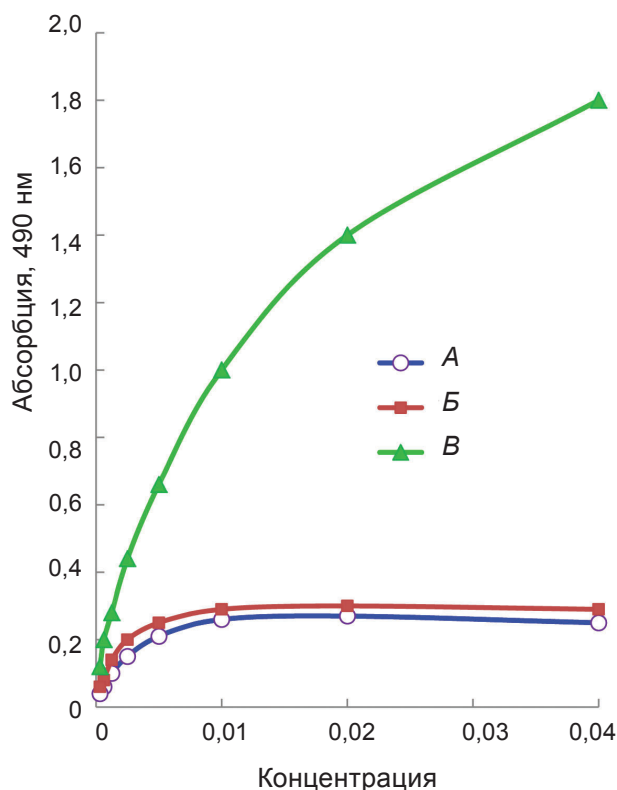


Рис. 1. Титрование с помощью ELISA интактной сыворотки мышей (А), ее иммуноглобулиновой фракции (Б), и титрование после её обработки 3,5 М KSCN (В) на иммобилизованном на плашке овальбумине

из большого числа антител, каждое из которых специфично к своему антигену, а наоборот, каждая отдельная молекула ПРИГ способна связываться с различными антигенами [1].

Этот вывод был подтвержден также и в других опытах [2], в которых было показано, что ПРИГ, элюированные с колонки, на которой был иммобилизован, к примеру, некий антиген А, в дальнейшем были способны связываться не только с тем же антигеном А, но и с иными, серологически неродственными антигенами Б, В, и т.д., причем примерно с такой же эффективностью, как и с антигеном А (рис. 2). Следовательно, упомянутые опыты однозначно продемонстрировали, что взаимодействие ПРИГ и разных неродственных антигенов является совершенно неспецифичным, причем эта неспецифичность связана не с большим набором разнообразных молекул ПРИГ, а неспецифичностью обладает каждая из молекул ПРИГ. Однако причина этой неспецифичности ПРИГ еще длительное время нам не была известной, и только после выясне-

ния механизма связывания ПРИГ с антигенами удалось решить и эту проблему.

Механизм усиления активности ПРИГ

Одним из вопросов, касающихся обнаруженного феномена индуцированной полиреактивности иммуноглобулинов, был вопрос о причине, которая приводит к значительному повышению их реактивности в отношении разнообразных антигенов: воздействие 3,0–5,0 М KSCN, резкий сдвиг pH или нагревание до 58–60 °С. Наиболее простым и логичным объяснением казалось предположение о том, что среди пула иммуноглобулинов всегда имеются антитела самой разнообразной специфичности, заблокированные соответствующими антигенами. Тогда в результате упомянутых воздействий происходит разблокировка антител и соответственно их реактивность по отношению к антигенам заметно повышается. Другим объяснением данного феномена было предположение об изменении конформации молекул иммуноглобулинов под воздействием указанных реагентов, в результате чего они приобретают полиреактивные свойства.

Как показали эксперименты, первое из упомянутых объяснений было неверным. В-первых, как уже говорилось выше, нами было

установлено, что ПРИГ, полученные в результате обработки сывороточных иммуноглобулинов хаотропными ионами или низкими/высокими pH, не состоят из отдельных пулов антител, каждый из которых специфичен только к определённому антигену, а наоборот, состоят из молекул, каждая из которых способна неспецифически связываться с разными антигенами.

Во-вторых, нами были проведены эксперименты, в которых мы пытались обнаружить антигены, которые могли бы диссоциировать из предполагаемых комплексов с сывороточными антителами в процессе трансформации последних в ПРИГ [12]. В этих опытах очищенную фракцию иммуноглобулинов обрабатывали 3,5 М раствором KSCN при 25 °С в течение 15 мин, а затем полученную смесь фракционировали на колонке с сефадексом G75, что позволяло разделить высокомолекулярные иммуноглобулины, низкомолекулярные молекулы соли KSCN и предполагаемые диссоциируемые антигены неизвестных размеров. В результате такого фракционирования исследуемой смеси иммуноглобулинов и KSCN никаких блокирующих антигенов выявлено не было [12]. Поскольку нам не удалось обнаружить антигены, которые могли бы благодаря их отделению от иммуноглобулинов приводить к заметному усилению

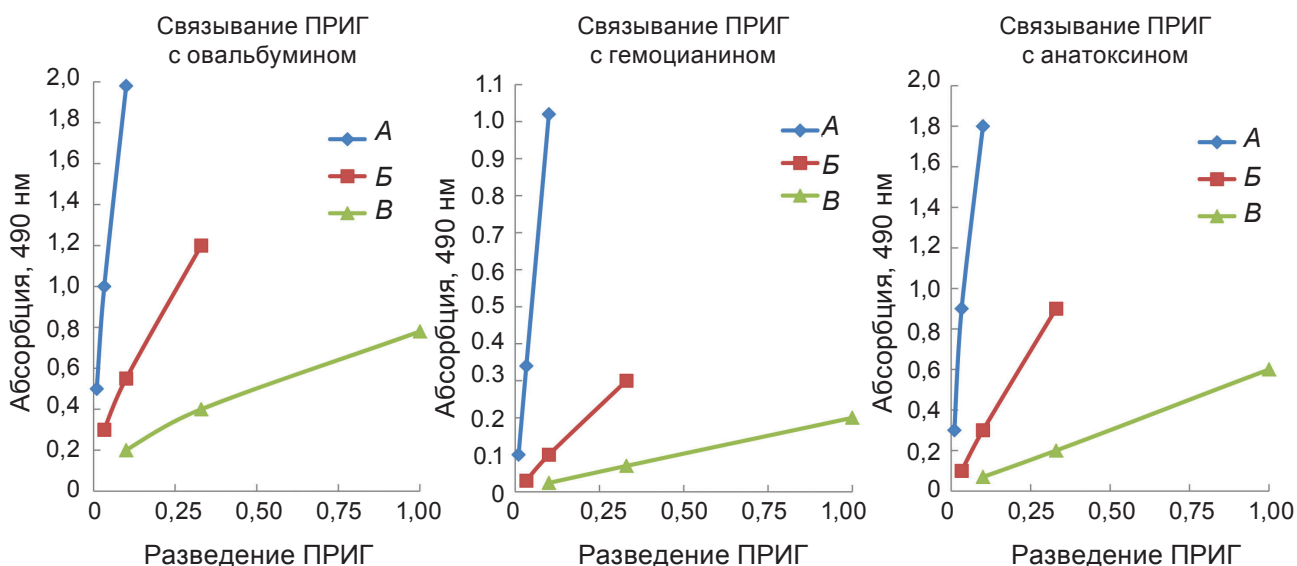


Рис.2. Связывание ПРИГ с иммобилизованными на платах овальбумином, гемоцианином улитки и анатоксином стафилококка. А – исходный образец ПРИГ; Б – образец ПРИГ, элюированный с колонки с иммобилизованным гемоцианином улитки; В – образец ПРИГ, элюированный с колонки с иммобилизованным анатоксином стафилококка

реактивности последних, гипотеза о разблокировании антител вторично была поставлена под сомнение.

И, наконец, в-третьих, нам удалось показать, что большинство высокоспецифичных моноклональных антител в результате их обработки 3,5–4,0 М KSCN или подкисления до pH 2,3–2,5 при 25 °С теряют свою специфичность и приобретают полиреактивные свойства (рис. 3). Отсюда следует вывод о том, что сывороточные иммуноглобулины, которые, как известно, являются смесью многочисленных клонов антител, направленных к разнообразным антигенам, способны под влиянием указанных воздействий приобретать полиреактивные свойства [13]. Благодаря полученным данным стало очевидным, что главной причиной усиления способности сывороточных иммуноглобулинов неспецифически связываться с антигенами (после обработки иммуноглобулинов 3,5–4,0 М KSCN или pH 2,3–2,5), является изменение конформации молекул, в результате чего происходит трансформация ранее специфичных сывороточных антител в неспецифичные ПРИГ.

В связи с этим возник также вопрос о том, какая часть молекулы иммуноглобулина в процессе трансформации в ПРИГ подвергается структурным изменениям. Как известно, молекулы антител состоят из трех частей: двух Fab-областей, ответственных за связывание с антигенами, и одной области Fc, на которой расположены сайты связывания с комплементом сыворотки, с Fc-рецепторами различных клеток, также эта область имеет сайты связывания с протеином А стафилококка. Наше предположение о том, что в процессе трансформации в ПРИГ структурным изменениям подвергаются прежде всего Fab-области иммуноглобулинов, тогда как Fc-область остается практически неизменной, нашло подтверждение в соответствующих экспериментах. Было установлено, что ПРИГ способны эффективно опсонизировать бактериальные клетки [9]. Это свидетельствует о неизменности структуры их сайтов связывания с Fc-рецепторами. Помимо этого, было показано, что ПРИГ способны связывать комплемент и стафилококковый протеин А [14]. Все эти данные подтверждают наше предположение о том, что трансформация иммуноглобулинов в ПРИГ приводит в основном к изменению свойств Fab-областей, ответственных за связывание

с антигенами, но мало влияет на конформацию Fc-области иммуноглобулинов, которая ответственна за эффекторные свойства антител [14].

Механизм связывания ПРИГ с антигенами

Изучение влияния различных факторов на процесс неспецифического связывания ПРИГ с антигенами привело к расшифровке механизма реакции ПРИГ–антиген. Вначале нами было исследовано влияние различных физико-химических условий на связывание ПРИГ с сорбированными на плашках антигенами, в частности, растворов некоторых солей различной концентрации, pH растворов, температуры. Также мы пытались оценить аффинность связывания ПРИГ с антигенами [6, 7]. Однако полученные данные не позволили установить механизм реакции ПРИГ–антиген, поскольку все они, за исключением влияния температуры, давали относительно мало информации о различиях между ПРИГ и специфичными антителами в отношении механизма их связывания с антигенами. А тот факт, что повышение температуры вплоть до физиологических значений (30–37 °С) чрезвычайно важно для успешного взаимодействия ПРИГ с антигенами, тогда как эти же температуры имеют значительно меньшее влияние на связывание специфичных антител с антигенами, неплохо согласуется с обнаруженным впоследствии механизмом реакции ПРИГ–антиген.

Отметим, что причина неспецифичности ПРИГ (или низкой специфичности НАг) интересовала не только нас, но и других исследователей, обнаруживших как сывороточные [15–18], так и моноклональные антитела, перекрестно реагирующие с разными антигенами [18–20]. Обычно эту неспецифичность объясняют тем, что она прежде всего связана с повышенной гибкостью (и, как следствие, с высокой подвижностью) полипептидной цепи антител, расположенных в районе их связывания с антигенами [1, 21–25]. Полагают, что благодаря этому происходит подгонка структур поверхностей двух взаимодействующих молекул, которые становятся взаимно комплементарными. Идея о важности повышенной подвижности полипептидной цепи у молекул ПРИГ не потеряла своей привлекательности и для нашей модели взаимодействия ПРИГ с антигенами, однако в этой модели глав-

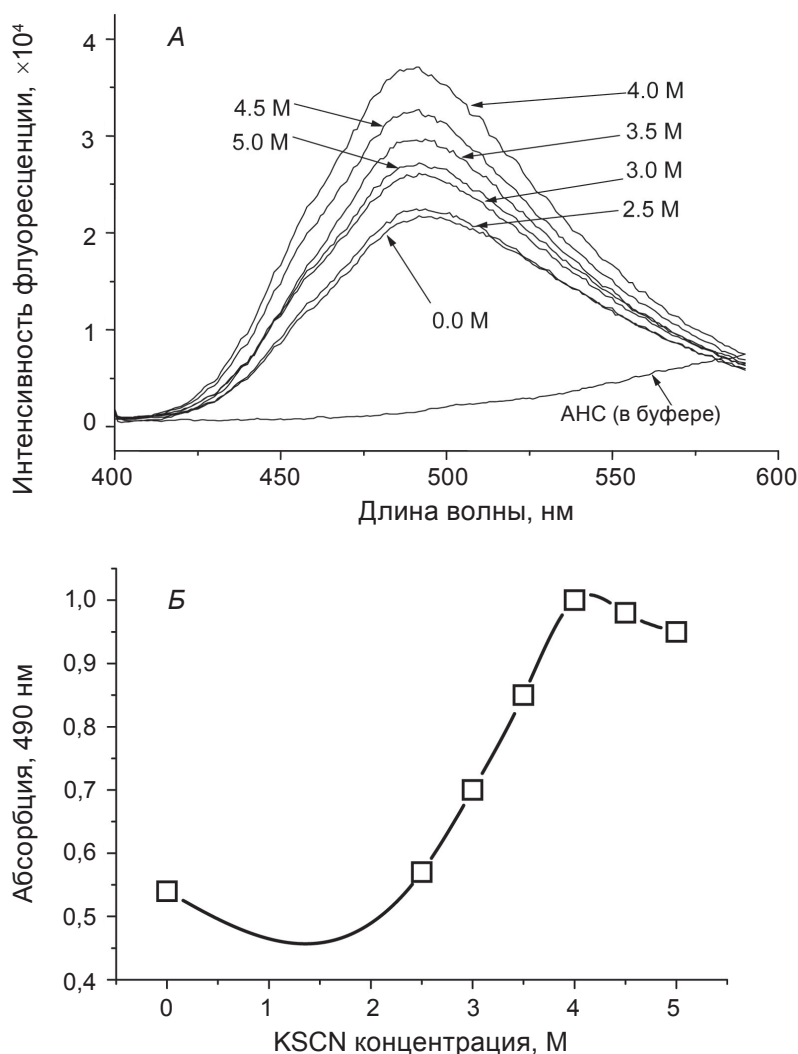


Рис. 3. А – связывание АНС с иммуноглобулинами сыворотки крови крупного рогатого скота, предварительно обработанными растворами KSCN различной концентрации (от 2,5 до 5,0 М); Б – связывание тех же образцов сыворотки крови крупного рогатого скота, предварительно обработанных растворами KSCN различной концентрации (от 2,5 до 5,0 М) с сорбированным на плашке бычьим сывороточным альбумином

ная причина их взаимного сродства стала несколько иной.

Основным при установлении механизма связывания ПРИГ с антигенами, послужил обнаруженный нами факт, что трансформация иммуноглобулинов в ПРИГ приводит к приобретению последними значительно большего сродства к гидрофобным материалам. В частности, ПРИГ значительно эффективнее способны сорбироваться на поверхности иммунологических плашек, чем исходные, не подвергшиеся трансформации в ПРИГ интактные иммуноглобулины. В связи с этим возникла идея о том, что основным

фактором, обуславливающим неспецифическое связывание ПРИГ с неродственными антигенами может быть их взаимное гидрофобное взаимодействие. Проведенные в этом направлении эксперименты полностью подтвердили наше предположение.

Как известно, связывание специфических антител с соответствующими антигенами зависит в основном от электростатических (кулоновских) сил, от сил Ван-дер-Ваальса, а также, возможно, гидрофобного взаимодействия [26–28], причем первые два типа сил играют основную роль. В связи с тем, что упомянутые силы, осо-

бенно силы Ван-дер-Ваальса, значительно увеличиваются при уменьшении расстояния между взаимодействующими поверхностями, было очевидным, что для высокой аффинности реакции антиген–антитело нужна как можно более высокая комплементарность поверхностей реагирующих макромолекул. Поэтому полагают, что основными моделями связывания антител с антигенами является модель ключ–замок или же модель индуцированной подгонки структуры антител и антигена. Первая из упомянутых моделей подразумевает, что формы взаимодействующих поверхностей антитела и антигена изначально подходят друг другу как ключ к замку, а вторая модель предполагает, что конформация взаимодействующих молекул может незначительно меняться в процессе их взаимодействия, в результате чего они становятся ещё более комплементарными друг другу.

В случае неспецифического связывания ПРИГ с антигенами, согласно нашим данным, основную роль играет межмолекулярное гидрофобное взаимодействие [29, 30]. Об этом свидетельствует следующее. Во-первых, как уже говорилось выше, трансформация иммуноглобулинов в ПРИГ сопровождается усилением их способности связываться с гидрофобными материалами, например, с поверхностью полистероловых плашек, предназначенных для иммунологических исследований.

Другой, весьма популярный, тест на степень гидрофобности исследуемых протеиновых макромолекул является спектрофотометрическая оценка способности этих молекул связываться с 8-амино-1-нафтол-5-сульфокислотой (АНС). С помощью этого теста нами было показано [30], что способность к связыванию АНС, и, следовательно, количество гидрофобных участков на поверхности иммуноглобулинов в результате их трансформации в ПРИГ значительно возрастает (рис. 3, А). При этом наблюдается корреляция между способностью молекул ПРИГ связывать АНС и реактивностью ПРИГ в отношении иммобилизованных на плашках антигенов (рис. 3, Б). Эти данные подтверждает вывод о заметном повышении способности ПРИГ к гидрофобному взаимодействию по сравнению с исходными молекулами иммуноглобулинов и о корреляции реактивности ПРИГ со степенью гидрофобности его молекул.

Во-вторых, такие низкомолекулярные вещества, как твин 20 или АНС, способные свя-

зываться с гидрофобными участками протеиновых молекул и, как следствие, экранировать их, очень слабо влияют на связывание специфичных антител с антигенами, но зато подобные вещества чрезвычайно эффективно подавляют неспецифическое связывание ПРИГ (рис. 4, А и Б) [30]. Таким образом, и этот тест также говорит о необходимости гидрофобного взаимодействия для успешного связывания ПРИГ с антигенами.

И, в-третьих, нами было показано, что тепловая денатурация протеиновых молекул, используемых в качестве антигенов, приводит к тому, что эти молекулы, сорбированные на иммунологических платах и экспонирующие на своей поверхности большое количество гидрофобных участков, значительно эффективнее связывают ПРИГ, чем исходные, интактные молекулы антигена. Таким образом, гидрофобное взаимодействие в реакции связывания ПРИГ с антигенами можно считать полностью доказанным и, следовательно, основной механизм неспецифического взаимодействия ПРИГ с разнообразными антигенами является установленным [29, 30].

Повышение активности ПРИГ *in vivo*

Очевидно, что ПРИГ обладают рядом свойств, которые позволяют отличить их от специфичных антител. Вместе с тем, оставалось неясным, возможно ли, хотя бы в принципе, значительное повышение активности сывороточных ПРИГ *in vivo*, или же этот процесс можно осуществить только в эксперименте, причем исключительно *in vitro*. Поскольку совершенно очевидно, что ни высокие концентрации хаотропных ионов, ни резкие сдвиги pH, ни нагревание до 58–60 °C не могут быть достигнуты *in vivo*, то встал вопрос о поиске таких условий, которые могли бы существовать *in vivo*, и при этом сывороточные иммуноглобулины были бы способны трансформироваться в ПРИГ.

Как оказалось, фактором, который отвечает перечисленным выше условиям, могут быть так называемые активные формы кислорода (АФК), к которым относятся, например, пероксид водорода (H₂O₂), супероксидный радикал (O⁻), или гидроксильный радикал (ОН[•]) [31–33]. Нами было установлено [8], что АФК не только способны вызывать трансформацию специфичных моноклональных антител в ПРИГ или значительно повышать активность сывороточных иммуно-

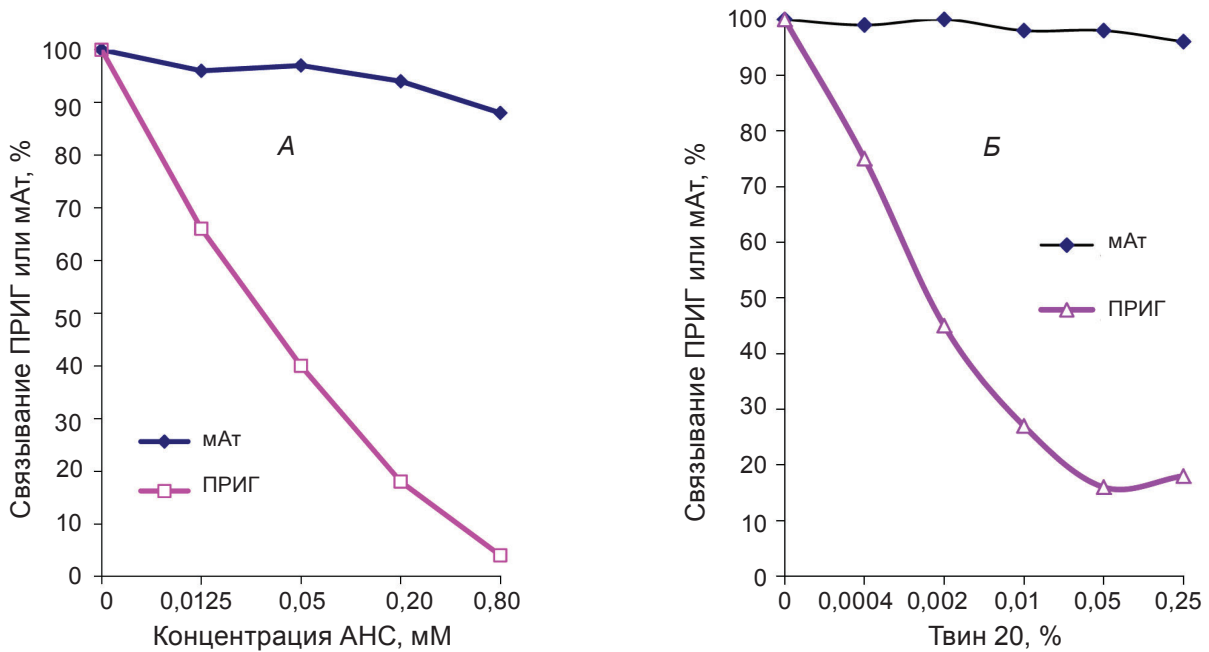


Рис. 4. Блокирование связывания ПРИГ с сорбированным на плашке антигеном с помощью разных концентраций АНС (А) или твина 20 (Б) и отсутствие влияния этих реагентов на связывание специфических МАТ с тем же антигеном

глобулинов, но и то, что по этим показателям они заметно превосходят такие физико-химические факторы, как хаотропные ионы, низкие/высокие рН или же нагревание до 58–60 °С. Например, смесь лизата эритроцитов и H_2O_2 , являющаяся источником АФК, в значительной степени индуцирует трансформацию сывороточных иммуноглобулинов в ПРИГ (рис. 5) [8]. Примерно таким же влиянием на трансформацию в ПРИГ сывороточных иммуноглобулинов (рис. 6, А) или МАТ (рис. 6, Б) обладает и иной источник АФК, а именно, смесь ЭДТА и соли металла переменной валентности, например $FeSO_4$.

О том, что именно АФК являются тем фактором, который в упомянутых экспериментах вызывают преобразование антител в ПРИГ, свидетельствует и тот факт, что вещества, способные нейтрализовать АФК (манитол, азид натрия, или $NaHCO_3$) эффективно подавляют этот процесс. Таким образом, не только хаотропные ионы, резкий сдвиг рН или высокая температура (56–60 °С), но и АФК способны значительно повышать активность ПРИГ. К сказанному можно добавить, что способностью трансформировать иммуноглобулины в ПРИГ обладает также раствор этанола (оптимальная концентрация 30–40%) при температуре 37 °С, а также некоторые

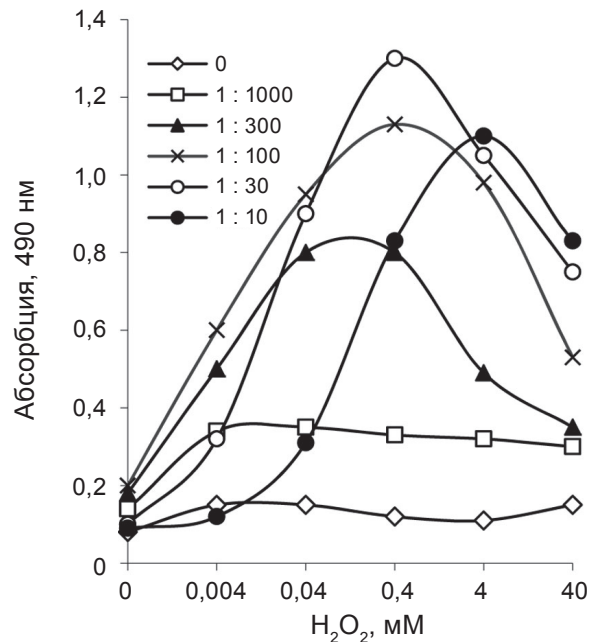


Рис. 5. Влияние эритроцитарного лизата в различных разведениях и пероксида водорода на способность сывороточных иммуноглобулинов связываться с иммобилизованными антигенами

другие органические растворители, например, 40–80%-й раствор диметилсульфоксида [34].

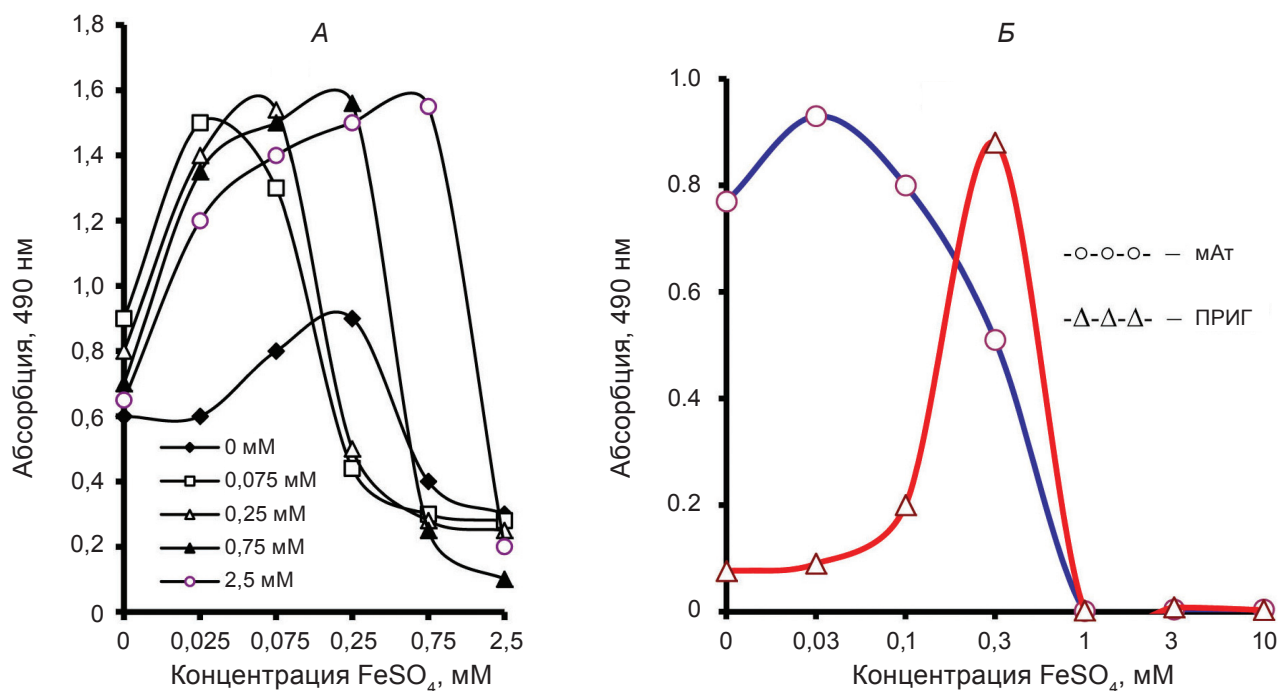


Рис. 6. Влияние ЭДТА в различных концентрациях и FeSO₄ на способность сывороточных иммуноглобулинов трансформироваться в ПРИГ (А) и индукция трансформации в ПРИГ моноклональных антител (Б), сопровождающаяся снижением активности мАт и появлением пика активности ПРИГ при концентрации FeSO₄ равной 0,3 мМ

Тот факт, что АФК способны вызывать преобразование антител в ПРИГ, имеет важное значение, поскольку, как известно, АФК могут вырабатываться *in vivo*, например, в местах воспаления или же при ишемии/реперфузии мышц [35, 36]. Следовательно, эти факты говорят о том, что, по крайней мере, повышение активности ПРИГ может, по-видимому, происходить при определенных условиях не только *in vitro*, но и *in vivo*. Чтобы выяснить, может ли действительно происходить повышение активности ПРИГ *in vivo* и происходит ли трансформация специфичных мАт в ПРИГ нами были поставлены следующие эксперименты.

Одним мышам вводили внутримышечно смесь ЭДТА и FeSO₄, другим – этанол, разведенный до 40% в физиологическом растворе NaCl, у третьих животных осуществляли ишемию/реперфузию мышц задней ноги мыши. Установлено, что во всех этих случаях происходит незначительное усиление активности ПРИГ *in vivo*, причем образовавшиеся ПРИГ можно выявить не только в кровотоке, но и с помощью

иммунофлуоресцентных или гистохимических методов выявить прикрепившиеся ПРИГ к стенкам кровеносных сосудов (рис. 7) [34]. Таким образом, нами было установлено, что действительно при определенных условиях преобразование антител в ПРИГ *in vivo* возможно. В связи с этим возник вопрос, могут ли ПРИГ играть какую-либо роль в защите организма или же наоборот способствовать развитию определенных заболеваний?

Как уже говорилось выше, нами было установлено [9], что ПРИГ способны эффективно опсонизировать микроорганизмы и, следовательно, усиливать фагоцитоз микробов клетками ретикулоэндотелиальной системы. Значит как и НАТ ПРИГ могут считаться одним из компонентов первой линии защиты от различных инфекций. Позднее нами было также показано, что ПРИГ мало влияют на уровень гуморального иммунного ответа мышей к эритроцитам барана, однако в несколько раз усиливают антителообразование в отношении такого низкоиммуногенного антигена, как очищенный дериват туберкулина

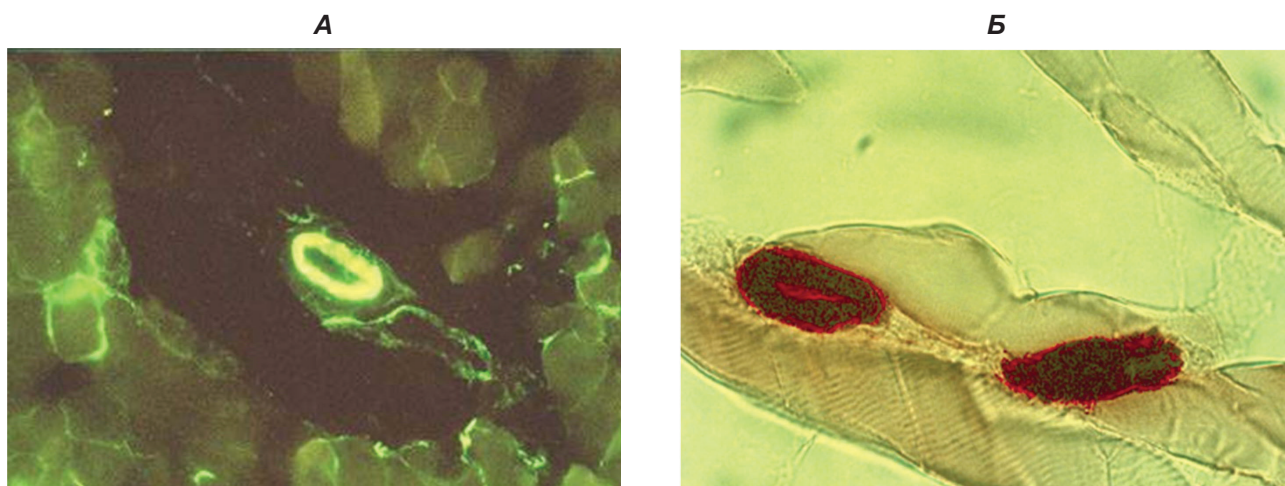


Рис. 7. Ультратонкие срезы мышц задней конечности мышей, демонстрирующие связывание ПРИГ со стенками кровеносных сосудов. А – окрашивание среза мечеными флуоресцеином козыми анти-Ig антителами мыши ($\times 100$ раз); Б – окрашивание среза дезоксибензидином + H_2O_2 , а затем гематоксилином [38] ($\times 400$ раз)

[14]. Следовательно, эти данные подтверждают предположение о защитных функциях ПРИГ, по крайней мере, при некоторых заболеваниях.

С другой стороны, поскольку ПРИГ могут связываться со стенками кровеносных сосудов [34], да еще и способны связывать комплемент, то нельзя исключить того, что ПРИГ могут способствовать развитию такого заболевания, как атеросклероз. Более того, при попытке выявить защитные функции ПРИГ при злокачественных новообразованиях нами было установлено, что ПРИГ не только не подавляет процесс развития опухоли, а, наоборот, в значительной степени стимулирует этот процесс (рис. 8) [10]. Таким образом, наши данные указывают на то, что ПРИГ могут играть как положительную роль при инфекционных заболеваниях, так и, по-видимому, отрицательную – при развитии атеросклероза или при канцерогенезе. Эти данные говорят также о том, что дальнейшее изучение свойств ПРИГ и их роли в развитии многих заболеваний заслуживает более пристального внимания.

Авидность взаимодействия ПРИГ и антигенов

В связи с тем, что свойства ПРИГ в значительной степени сходны со свойствами НАт, можно было ожидать, что аффинность взаимодействия ПРИГ с антигенами является очень низкой, как это неоднократно было сказано о НАт [21–23, 35–40]. Действительно, наши первые

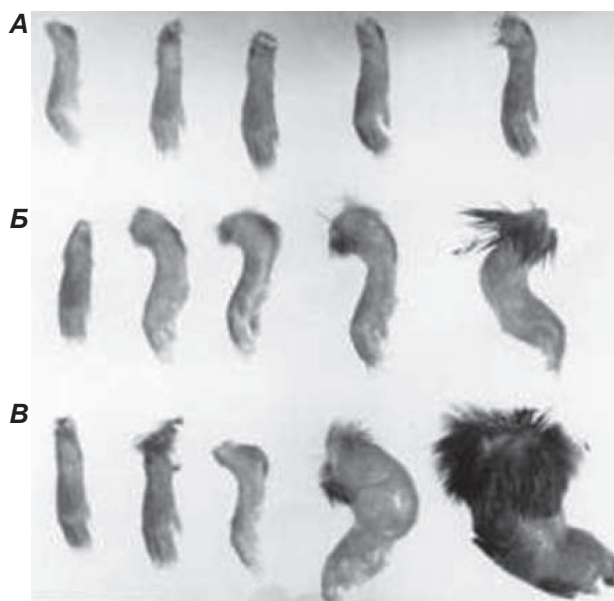


Рис. 8. Влияние ПРИГ на развитие злокачественной опухоли, индуцированной введением клеток карциномы Льюис. А – в заднюю конечность мышей вводили определенную дозу клеток карциномы (контроль). Б – вначале мышам вводили ПРИГ внутрибрюшинно, а затем клетки карциномы в лапку. В – клетки карциномы инкубировали с ПРИГ в течение 30 мин при $37^\circ C$, а затем вводили в заднюю конечность мышам

эксперименты по оценке аффинности ПРИГ [6], выполненные по методу Friguet et al. (1985) [41] или иными подобными методами [42–45], так-

же указали на очень низкую аффинность ПРИГ, что, казалось бы, хорошо укладывалось в общепринятую картину прямой взаимосвязи между низкой специфичностью и низкой аффинностью взаимодействия.

Однако позднее, когда механизм взаимодействия ПРИГ с антигенами стал известным [29, 30], у нас появились сомнения в том, что подобные методы можно применять для определения аффинности ПРИГ. Находясь в водной среде, протеиновая макромолекула стремится спрятать свои гидрофобные участки внутри молекулы, а снаружи находятся в основном гидрофильные участки, контактирующие с молекулами воды. Поскольку для связывания ПРИГ с молекулами антигена нужны как раз гидрофобные участки на поверхности антигена, то измерение аффинности взаимодействия методом Friguet et al. (1985) или подобными методами [42–45] неминуемо приведёт к оценкам, которые в сотни и даже тысячи раз ниже истинных значений данной величины по следующим причинам.

Известно, что для вычисления аффинности антител упомянутыми выше способами определяют или концентрацию свободных антител, или же концентрацию их комплексов с антигеном после достижения в смеси антиген/антитело динамического равновесия, что позволяет с помощью преобразованного закона действия масс вычислить константу аффинности. Возникает вопрос, пригодны ли подобные методы для оценки аффинности ПРИГ, которые имеют средство к гидрофобным областям молекул?

Благодаря внутримолекулярной динамике протеиновых молекул на их поверхности могут на короткое время появляться гидрофобные участки, которые способны связаться с гидрофобными участками Fab-областей ПРИГ при столкновении этих молекул. Поскольку протеиновых молекул, в данный момент экспонирующих на своей поверхности гидрофобные участки, только небольшая часть из общего числа этих молекул, то ясно, что при оценке аффинности вычисленная константа равновесия, рассчитанная на основе оценки того, какая концентрация молекул антигена необходима для блокировки определённой части ПРИГ, неизбежно будет на несколько порядков занижена.

В дополнение к вышеизложенному отметим и то, что с молекулой антигена, у которой кратковременно экспонирован гидрофобный участок, не обязательно должна столкнуться своим

паратопом именно молекула ПРИГ. С намного большей вероятностью с нею свяжется другая такая же молекула антигена, поскольку в подобных опытах концентрация молекул антигена значительно выше, чем концентрация ПРИГ. Благодаря этому молекула ПРИГ останется не заблокированной антигеном. Следовательно, из-за подобного эффекта, оценка аффинности взаимодействия ПРИГ с данным антигеном окажется ещё более заниженной и может казаться в миллионы раз меньше, чем является на самом деле. Исходя из этого, становится очевидным, что общепринятые методы, разработанные для оценки аффинности связи специфичных антител с антигеном, основывающиеся на законе действия масс, являются совершенно непригодными для оценки аффинности ПРИГ в водной среде по отношению к растворимым антигенам, поверхность которых является в основном гидрофильной.

Чтобы получить экспериментальное подтверждение сделанного нами вывода, необходимо было использовать не оценку эффективности блокирования ПРИГ растворимым гидрофильным антигеном, а совсем иные подходы. Одним из них является оценка скорости диссоциации специфичных антител или ПРИГ, связанных с сорбированным на плашке антигеном. Так как реакция антител или ПРИГ с антигенами является обратимой, то находящиеся в комплексе с иммобилизованным антигеном ПРИГ или специфичные антитела могут диссоциировать в окружающий раствор, причем скорость этой диссоциации должна быть тем большей, чем ниже авидность связи между указанными реагентами.

В том случае, если аффинность и авидность взаимодействия определённого антитела с сорбированным антигеном будет относительно высокой (например, аффинность равна $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ и выше), то количество диссоциировавших антител с иммобилизованного антигена при достижении состояния равновесия в данной системе будет настолько малым, что зафиксировать этот процесс с помощью даже такого высокочувствительного метода, как ELISA, не представляется возможным. Об этом свидетельствуют как теоретические расчеты, так и результаты наших экспериментов [46].

Однако в том случае, если в качестве элюирующего раствора использовать раствор того же антигена, что и иммобилизованный на твердо-

фазном носителе, то этот процесс можно многократно усилить, благодаря чему элюцию антител легко выявить самыми разными способами. Действительно, нами было обнаружено, что инкубация раствора овальбумина в лунках плат, на которых вначале был иммобилизован овальбумин, а затем на нем сорбированы мАт, приводила к весьма ощутимой элюции ранее связавшихся высокоаффинных антител (рис. 9, А). Вместе с тем, этот же раствор антигена совершенно не индуцировал диссоциацию связанного с овальбумином ПРИГ. Эти результаты свидетельствуют о том, что avidность связывания ПРИГ с данным антигеном является, по крайней мере, не меньшей, чем у специфичных мАт, а, возможно, заметно выше.

Еще одним методом, который позволяет сравнить avidность связывания специфичных антител и ПРИГ, является метод десорбции ранее сорбированных на антигене антител или ПРИГ при помощи концентрированных растворов хаотропных ионов, например, 3,0–4,0 М раствора KSCN. В связи с этим нами была сделана попытка использовать данный подход для сравнения avidности взаимодействия мАт или ПРИГ с сорбированным на плашке овальбумином или с миоглобином лошади.

Было установлено [46], что инкубация раствора KSCN в лунках плашки, на которой предварительно был иммобилизован антиген, а за-

тем с ним были связаны специфичные мАт или ПРИГ, действительно приводит к эффективной элюции как связавшихся мАт, так и ПРИГ. При этом в течение 20 мин при комнатной температуре растворы 4,0–6,0 М KSCN вызывали от 30 до 80% элюции мАт, тогда как те же растворы KSCN также вызывали диссоциацию ПРИГ с иммобилизованного овальбумина, однако эффект был всё же несколько слабее, чем при диссоциации высоко аффинных мАт (рис. 9, Б). Таким образом, эти данные также свидетельствуют, о том, что avidность ПРИГ ничуть не ниже, чем avidность высокоаффинных антител.

Важно также отметить, что сходные данные были получены нами как при использовании ПРИГ, полученных искусственно, т.е. путем трансформации специфичных мАт при помощи KSCN, так и в том случае, когда в опытах использовали интактные ПРИГ из сывороток человека или мышей. Это подтверждает ранее сделанный нами вывод о сходстве или даже идентичности «искусственных» (или индуцированных) ПРИГ и «естественных» (или интактных) ПРИГ.

Таким образом, на основании полученных данных можно считать установленным, что ПРИГ взаимодействуют с антигенами с очень высокой avidностью, которая, по меньшей мере, не уступает avidности специфичных антител, а, возможно, даже превосходит её. Отсюда также следует, что ранее существовавшее мнение

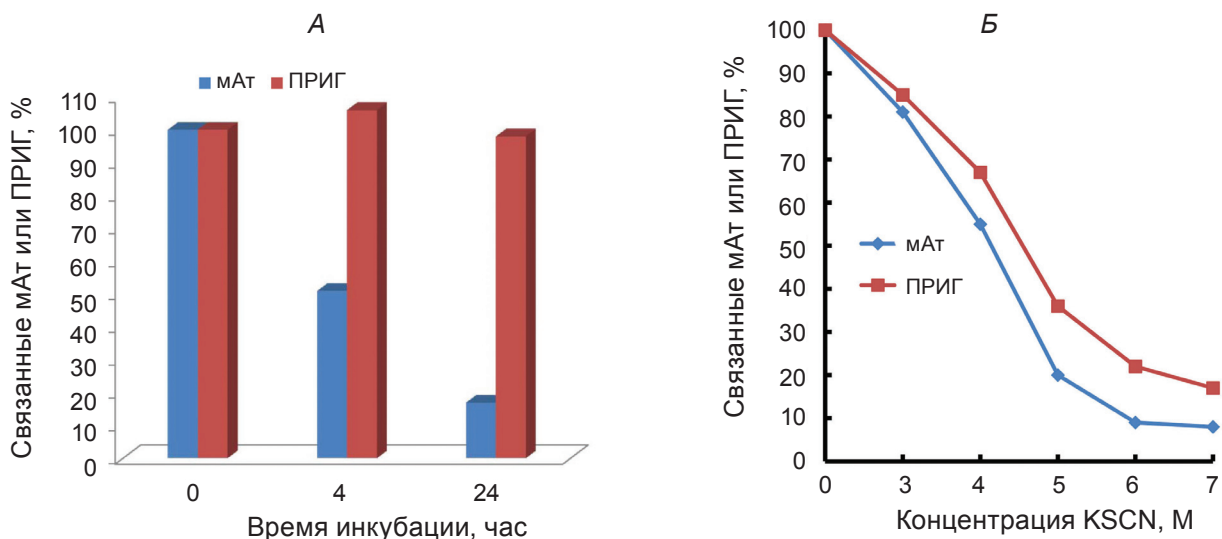


Рис. 9. А – диссоциация мАт и полное отсутствие диссоциации ПРИГ с сорбированного на плашке овальбумина под влиянием раствора овальбумина (36 мг/мл); Б – диссоциация мАт или ПРИГ, которые предварительно были связаны с иммобилизованным на плашке антигеном под влиянием растворов KSCN различной молярности (в течение 20 мин при комнатной температуре)

о чрезвычайно низкой аффинности, а, следовательно, низкой avidности ПРИГ [47], было ошибочным.

Различия между ПРИГ и НАт

В связи с тем, что ранее в литературе были описаны так называемые натуральные (или естественные) антитела (НАт), которые обладали относительно низкой специфичностью к соответствующим антигенам и к тому же были способны перекрестно реагировать с неродственными антигенами [15–20], перед нами всегда стоял вопрос о том, не являются ли обнаруженные нами ПРИГ идентичными НАт. Наши первые попытки экспериментально оценить аффинность связывания ПРИГ с антигенами также показали, что получаемые величины константы аффинности являются чрезвычайно низкими [48]. Эти данные ещё более усилили наши подозрения о том, что ПРИГ и НАт могут быть очень похожими или даже идентичными. Если бы это действительно было так, то эффект значительного повышения активности ПРИГ после обработки раствора предполагаемых НАт с помощью KSCN или же его подкисления до pH 2,0–2,5 можно было бы объяснить тем, что происходит разблокировка НАт, которые до этого были заблокированы некими сывороточными антигенами вследствие невысокой специфичности НАт.

Однако, как уже говорилось выше, позже нами было установлено, что активация ПРИГ не связана с разблокированием ранее существовавших сывороточных антител. Более того, упомянутый выше анализ механизма взаимо-

действия ПРИГ с антигенами привел к выводу о том, что методы, в основном использовавшиеся для оценки аффинности специфичных антител к соответствующим антигенам, совершенно непригодны для оценки аффинности неспецифического связывания ПРИГ с антигенами [46], а, следовательно, аффинность ПРИГ может быть намного выше, чем считалось ранее. Эксперименты полностью подтвердили этот вывод и позволили установить, что действительно avidность взаимодействия ПРИГ с антигенами в тысячи раз выше, чем avidность связывания НАт. Этот факт говорит о том, что ПРИГ и НАт – это не одна и та же субстанция, и они могут быть идентифицированы с помощью данного теста. Ранее нами были предложены также некоторые иные тесты, которые позволяют различить ПРИГ и специфичные антитела [48].

Помимо этого, нами было установлено, что ПРИГ и НАт различаются рядом свойств, которые также можно использовать для идентификации данных субстанций. Как уже говорилось ранее, ПРИГ можно считать практически неспецифичными, тогда как НАт всё же обладают некоторой специфичностью, хотя иногда наблюдается заметная перекрестная реактивность к некоторым антигенам. К тому же, различные физико-химические факторы или реагенты по-разному влияют на связывание НАт и ПРИГ с антигенами. Все эти различия суммированы в таблице.

Учитывая перечисленные данные, можно сделать вывод, что эффекторные свойства молекул, зависящие от Fc-области (такие как опсони-

Влияние различных факторов на реакцию взаимодействия специфичных антител или ПРИГ с антигенами

Факторы влияния	Низкоспецифичные антитела	ПРИГ
Специфичность	низкая	отсутствует
Температурная зависимость	низкая	высокая
Твин 20	не влияет	супрессирует
АНС	мало влияет	супрессирует
Лизоцим	не влияет	стимулирует
Протамин	не влияет	стимулирует
Авидность	низкая	высокая
Опсонизация микробов	есть	есть
Связывание протеина А стафилококка	есть	есть
Связывание комплемента	есть	есть

зация микробов, связывание протеина А стафилококка и связывание комплемента) у ПРИГ и у специфичных антител являются сходными или идентичными. С другой стороны, механизмы связывания специфичных антител и ПРИГ с антигенами, зависящие от Fab-областей молекул, имеют существенные различия. Поскольку НАт являются всё же специфичными антителами, хотя и обладают низкой специфичностью и способностью перекрестно реагировать с некоторыми неродственными антигенами, то указанные различия позволяют сделать вывод, что ПРИГ и НАт являются различными субстанциями. Эти различия позволяют не только дискриминировать НАт и ПРИГ, но и сделать вывод о том, что НАт и ПРИГ, по всей видимости, могут выполнять в организме неодинаковые биологические функции.

Изменение активности ПРИГ с возрастом

Учитывая то, что ПРИГ обладают свойствами, отличными от специфичных антител, и тот факт, что в настоящее время роль ПРИГ в защите организма при различных заболеваниях или разном физиологическом состоянии организма пока что неизвестна, мы попытались оценить активность ПРИГ в сыворотках человека в зависимости от возраста людей. Очевидно, чтобы выполнить подобное исследование, необходимо уметь различать иммуноглобулины, принадлежащие к ПРИГ, от иммуноглобулинов, являющихся естественными антителами, которые с низкой аффинностью способны связываться с соответствующими антигенами. Поскольку одной из последних наших работ [46, 48] был предложен метод, позволяющий различить ПРИГ и НАт, нам удалось выполнить эту работу. Основной идеей этого метода является использование в качестве антигена для выявления ПРИГ сывороточного альбумина того животного, уровень ПРИГ которого собираются определять, поскольку, как правило, сыворотка не содержит естественных антител к собственному сывороточному альбумину. Другим важным условием определения ПРИГ является использование специальных условий, в которых активность ПРИГ, как было нами показано ранее [48], значительно возрастает, а именно при титровании ПРИГ в растворе протамина (0,1 мг/мл) в ТЗФР, содержащем 0,05% твина 20.

На рис. 10, А представлены кривые титрования IgG ПРИГ в сыворотках пяти практически здоровых молодых (возраст до 25 лет) или пяти пожилых (возраст около 70 лет) людей. Как видно из рисунка, активность сывороточных IgG ПРИГ у пожилых людей в целом превосходит этот показатель у молодых, взрослых людей. Если вычислить средние уровни активности сывороточных IgG ПРИГ у данных двух групп людей (рис. 10, Б), то их титры у пожилых людей примерно в 3–4 раза выше, чем у молодых. Поскольку, согласно данным литературы [49–51], концентрация IgG иммуноглобулинов с возрастом может увеличиться (примерно на 5–15%), но значительно меньше, чем выявленное нами увеличение активности сывороточных IgG ПРИГ [11], то полученные нами данные свидетельствуют о том, что удельная активность IgG ПРИГ на единицу концентрации сывороточных иммуноглобулинов заметно возрастает с возрастом.

В отличие от значительного увеличения титров сывороточных IgG ПРИГ людей, активность IgM ПРИГ в сыворотках тех же особей в наших опытах не повышалась с возрастом, но зато значительно больше варьировала по величине, при этом у отдельных особей пожилого возраста была даже ниже, чем у некоторых молодых людей (рис. 11, А). В связи с этим можно сделать вывод, что в отношении среднего уровня активности сывороточных IgM ПРИГ (рис. 11, Б) не наблюдаются закономерности, обнаруженные нами в отношении активности IgG ПРИГ и что уровень сывороточных IgM ПРИГ больше зависит от индивидуальных особенностей иммунной системы субъекта.

Примерно к таким же выводам можно прийти и в отношении обнаруженного нами изменения активности сывороточных IgA ПРИГ с возрастом (рис. 12, А). Как и активность сывороточных IgM ПРИГ, которая, по-видимому, пропорциональна концентрации этих молекул в сыворотках крови, активность сывороточных IgA ПРИГ людей значительно больше варьирует по сравнению с активностью сывороточных IgG ПРИГ [11]. Вместе с тем у пожилых людей средняя активность сывороточных IgA ПРИГ все же незначительно возрастает (рис. 12, Б) по сравнению с молодыми, хотя и не так заметно, как активность сывороточных IgG ПРИГ.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что активность сывороточных

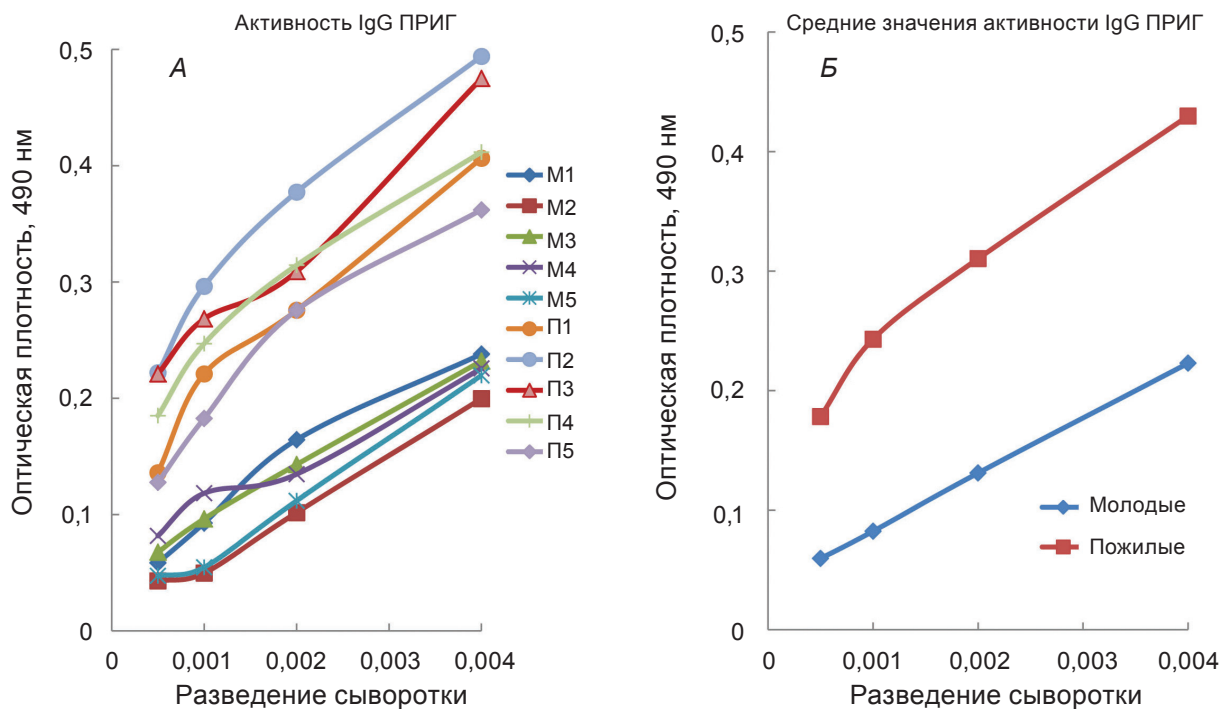


Рис. 10. Кривые титрования пяти сывороток молодых (М) и пяти сывороток пожилых (П) людей (А) на содержание IgG ПРИГ, а также средние значения полученных величин (Б)

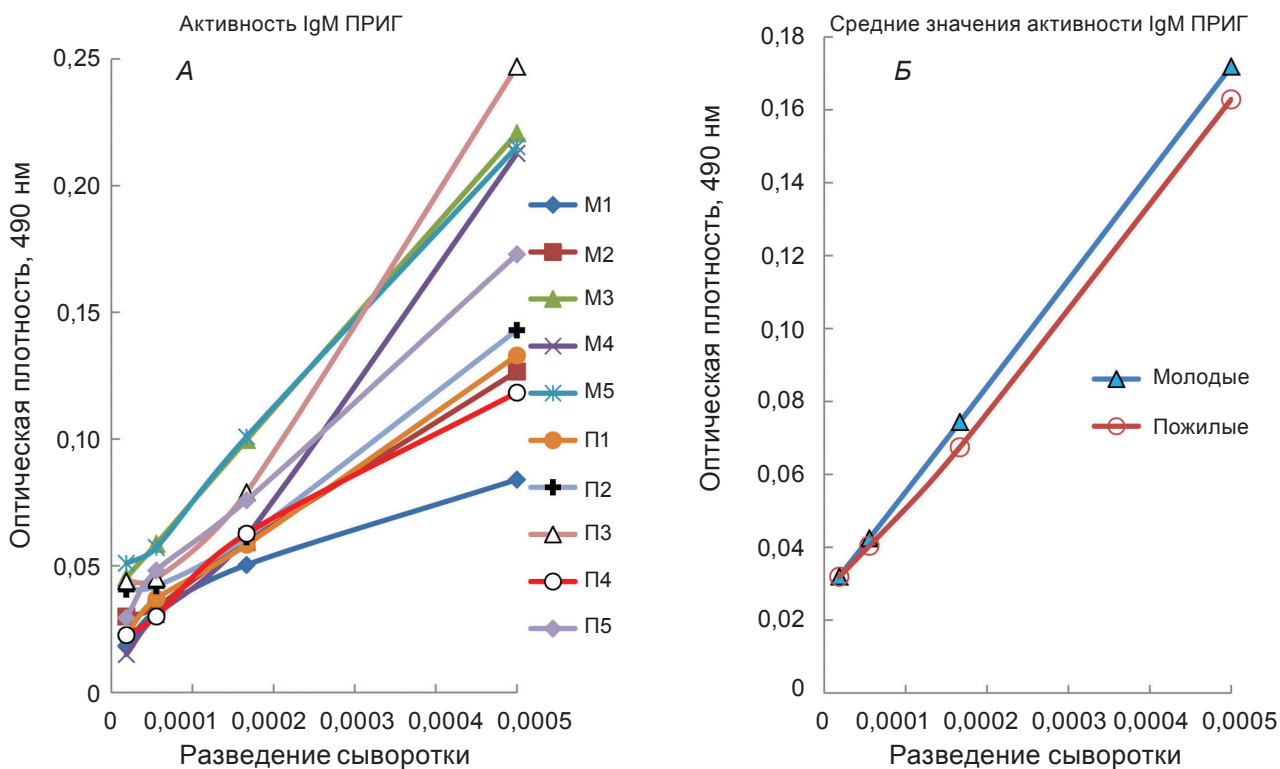


Рис. 11. Кривые титрования пяти сывороток молодых (М) и пяти сывороток пожилых (П) людей (А) на содержание IgM ПРИГ, а также средние значения полученных величин (Б)

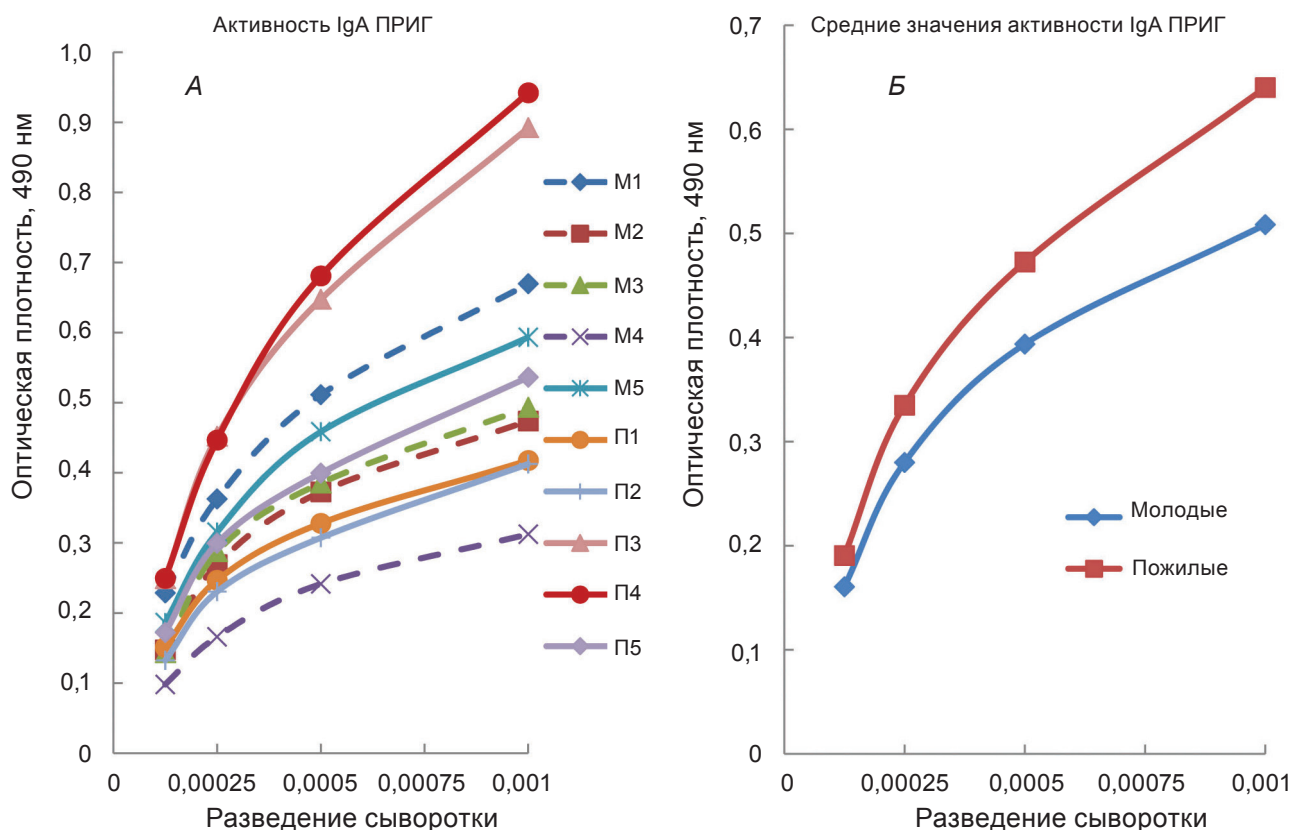


Рис. 12. Кривые титрования пяти сывороток молодых (М) и пяти сывороток пожилых (П) людей (А) на содержание IgA ПРИГ, а также средние значения полученных величин (Б)

ПРИГ может изменяться с возрастом преимущественно в сторону увеличения, причем наиболее заметно изменяется активность IgG ПРИГ, которая возрастает в 3–4 раза при увеличении возраста людей с 25 до 70 лет. Активность сывороточных IgM и IgA ПРИГ людей значительно больше варьирует, чем активность IgG ПРИГ, а повышение их активности с возрастом или совсем отсутствует, или, по крайней мере, не так заметно выражено. Обнаруженные нами [11], происходящие с возрастом у людей изменения активности сывороточных ПРИГ, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов, может свидетельствовать как о деградации иммунной системы с возрастом, так и о возможно важной функциональной роли этих иммуноглобулинов, которую только еще предстоит выяснить.

БІОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІРЕАКТИВНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

С. П. Бобровник, М. О. Демченко,
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Невідомий раніше феномен набутої поліреактивності сироваткових імуноглобулінів, які було оброблено концентрованими розчинами хаотропних іонів, таких як KSCN (3,0–5,0 М), а також низьких/високих рН (рН 2,2–3,0/ рН 11,0–12,0) або температурою до 58–60 °С, вперше було описано нами в 1990 р. Значно пізніше (через одинадцять років) схожі дані було опубліковано J. P. Bouvet зі співавт.

(2001 р.), котрі повністю підтвердили наші результати відносно впливу хаотропних іонів або різкого зсуву рН на підвищення поліреактивних властивостей сироваткових імуноглобулінів. Наші дослідження (1993, 1995, 1998 рр.) властивостей поліреактивних імуноглобулінів (ПРИГ) показали, що механізм їх неспецифічної взаємодії з антигенами значно різниться від механізму зв'язування специфічних антитіл із відповідними антигенами. Пізніше нами було показано, що підвищення активності ПРИГ може бути індуковано *in vivo* (1999 р.), а також, що ПРИГ є одним із компонентів інтактних сироваток людини і тварин, а це означає, не виключено, що вони можуть виконувати відповідні біологічні функції. Дослідження впливу ПРИГ на такі процеси, як фагоцитоз мікробів або розвиток злоякісних пухлин (S. A. Bobrovnik зі співавт., 1995, 1998 рр.) вказує на те, що ПРИГ можуть грати відповідну роль у захисті організму від інфекцій або за розвитку різноманітних патологічних процесів. Нещодавно нами було також встановлено (С. П. Бобровник зі співавт., 2014 р.), що з віком концентрація сироваткових IgG ПРИГ людини істотно зростає. Ці дані вказують на важливість подальших досліджень імунохімічних властивостей ПРИГ і біологічної ролі їх у захисті організму або в разі розвитку різноманітних захворювань.

Ключові слова: поліреактивні імуноглобуліни, натуральні антитіла, антигени, специфічність, афінність, авідність.

BIOLOGICAL AND IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF POLYREACTIVE IMMUNOGLOBULINS

S. A. Bobrovnik, M. A. Demchenko,
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: s-bobrov@bk.ru

A previously unknown phenomenon of acquired polyreactivity for serum immunoglobulins, which were subjected either to solutions of KSCN (3.0-5.0 M), low/high pH (pH 2.2-3.0), or heating to 58-60 °C, was described by us in 1990 year. Much later, eleven years after that, similar data were published by others, which completely confirmed our

results concerning the influence of either chaotropic ions or the drastic shift of pH on immunoglobulins polyreactive properties. Our further investigations of polyreactive serum immunoglobulins (PRIG) properties have shown that the mechanism of non-specific interaction between PRIG and antigens much differs from the mechanism of interaction between specific antibodies and corresponding antigens. Later we have shown that the increasing of PRIG reactivity could be induced *in vivo*, and PRIG are one of serum components for human or animal sera. Then, it could be suggested that PRIG can perform certain biological functions. Studying of PRIG's effect on the phagocytosis of microbes by peritoneal cells or the tumor growth have shown that PRIG can play a certain role in protecting the body from infections and probably can influence on the development of various pathological processes. Recently we have also found that PRIG IgG contents significantly increases in aged people. These data demonstrate that further investigations of PRIG's immunochemical properties and studying of their biological role in organism protection from various diseases is very intriguing and important.

Key words: polyreactive immunoglobulins, natural antibodies, antigens, specificity, affinity, avidity.

References

1. Bobrovnik S. A., Liashchenko K. P., Komisarenko S. V. Polyspecific antibodies and their activation. *Proc. National Acad. Ukraine*. 1990;(6):71-74. (In Russian).
2. Bobrovnik S. A. Activation of "silent" antibodies and their interaction with antigens. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1990;62(5):86-89. (In Russian).
3. Bouvet J. P., Stahl D., Rose S., Quan C.P., Kazatchkine M. D., Kaveri S. V. Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociating agents. *J. Autoimmun.* 2001;16(2):163-172.
4. Bouvet J.P., Quan C.P., Dighiero G. Polyreactivity is not an artifact. *J. Immunol. Methods.* 2001;254(1-2):199-201.
5. Bobrovnik S. A., Marinets A. V. Properties of polyreactive immunoglobulins. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1993;65(5):21-26. (In Russian).
6. Bobrovnik S. A. Polyreactive immunoglobulins: molecular properties and functions. *Comments Mol. Cel. Biophys.* 1999;9:323-356.

7. Bobrovnik S. A. Dynamics of the interaction of polyreactive immunoglobulins with immobilized antigens. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1998;70(6):135-143.
8. Bobrovnik S. A. Mechanisms for increasing the activity of polyreactive immunoglobulins *in vivo*. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1999;71(3):129-135. (In Russian)
9. Bobrovnik S. A., Veremeenko E. Yu., Petrova Yu. I., Komisarenko S. V. Evaluation of phagocytic activity of peritoneal cells with flow cytometry. *Proc. National Acad. Ukraine.* 1995;(11):139-142. (In Russian).
10. Bobrovnik S. A., Lavrenchuk G. I., Benkovska N. P., Chornaya N. E. Influence of polyreactive immunoglobulins on tumor cells proliferation. *Exp. Oncol.* 1998;(20):202-207.
11. Bobrovnik S. A., Demchenko M. A., Komisarenko S. V. Age changes of human serum polyreactive immunoglobulins (PRIG) activity. *Ukr. Biochem. J.* 2014;86(5):151-155. (In Russian).
12. Bobrovnik S. A., Petrova Yu. I., Efetov K. A. Transformation of serum immunoglobulins to polyreactive antibodies. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1997;69(3):36-42. (In Russian).
13. Bobrovnik S. A. Transformation of serum immunoglobulins and monoclonal antibodies into polyreactive immunoglobulins. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1997;69(5-6):97-109. (In Russian).
14. Bobrovnik S. A., Efetov K. A., Petrova Yu. I., Komisarenko S. V. Complement-binding and immuno-modulating properties of polyreactive immunoglobulins. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2003;75(3):104-108. (In Russian).
15. Avrameas S., Guilbert B., Dighiero G. Natural antibodies against tubulin, actin myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera, and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia may express similar antibody specificities. *Ann. Immunol. (Paris)*. 1981;132C(2):231-236.
16. Guilbert B., Dighiero G., Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J. Immunol.* 1982;128(6):2779-2787.
17. Coutinho A., Kazatchkine M. D., Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 1995;7(6):812-818.
18. Dighiero G., Guilbert B., Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies. *J. Immunol.* 1982;128(6):2788-2792.
19. Haspel M. V., Onodera T., Prabhakar B. S., McClintock P. R., Essani K., Ray U. R., Yagihashi S., Notkins A. L. Multiple organ-reactive monoclonal autoantibodies. *Nature.* 1983;304(5921):73-76.
20. Satoh J., Prabhakar B. S., Haspel M. V., Ginsberg-Fellner F., Notkins A. L. Human monoclonal autoantibodies that react with multiple endocrine organs. *N. Engl. J. Med.* 1983;309(4):217-220.
21. Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol. Today.* 1991;12(5):154-159.
22. Avrameas S., Ternynck T. The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts. *Mol. Immunol.* 1993;30(12):1133-1142.
23. Notkins A. L. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol.* 2004;25(4):174-179.
24. Zhou Z. H., Tzioufas A. G., Notkins A. L. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. *J. Autoimmun.* 2007;29(4):219-228.
25. Dimitrov J. D., Planchais C., Roumenina L. T., Vassilev T. L., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. Antibody polyreactivity in health and disease: *statu variabilis*. *J. Immunol.* 2013;191(3):993-999.
26. Absolom D. R., van Oss C. J. The nature of the antigen-antibody bond and the factors affecting its association and dissociation. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 1986;6(1):1-46.
27. Van Oss C. J. Hydrophobic and hydrophilic interactions in antigen-antibody binding. *IJBC.* 1987;3:1-8.
28. Van Oss C. J. Nature of specific ligand-receptor bonds, in particular the antigen-antibody bond. *J. Immunoassay.* 2000;21(2-3):109-142.
29. Bobrovnik S. A. Polyreactive immunoglobulins recognize hydrophobic parts of proteins. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2001;73(2):116-122. (In Russian).
30. Bobrovnik S. A. Mechanisms of interaction of polyreactive immunoglobulins and protein antigens. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2002;74(2):37-44. (In Russian).

31. Halliwell B., Gutteridge J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984;219(1):1-14.
32. Weiss S. J. The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1980;255(20):9912-9917.
33. Stadtman E. R. Protein oxidation and aging. *Science.* 1992;257(5074):1220-1224.
34. Bobrovnik S. A. Transformation of specific antibodies to polyreactive immunoglobulins and their binding to blood vessel walls. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2002;74(3):133-141. (In Russian)
35. Weiser M. R., Williams J. P., Moore F. D. Jr, Kobzik L., Ma M., Hechtman H. B., Carroll M. C. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J. Exp. Med.* 1996;183(5):2343-2348.
36. Carroll M. C., Prodeus A. P. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 1998;10(1):36-40.
37. Kobzik L., Bredt D.S., Lowenstein C.J., Drazen J., Gaston B., Sugarbaker D., Stamler J. S. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1993;9(4):371-377.
38. Ternynck T., Avrameas S. Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol. Rev.* 1986;94:99-112.
39. Casali P., Notkins A. L. CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today.* 1989;10(11):364-368.
40. Adib-Conquy M., Avrameas S., Ternynck T. Monoclonal IgG and IgM autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies. *Mol. Immunol.* 1993;30(2):119-127.
41. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods.* 1985;77(2):305-319.
42. Stevens F. J. Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody. *Mol. Immunol.* 1987;24(10):1055-1060.
43. Bobrovnik S. A. Determination of antibody affinity using ELISA. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1999;71(6):90-102. (In Russian).
44. Bobrovnik S. A. Determination of antibody affinity by ELISA. *Theory. J. Biochem. Biophys. Methods.* 2003;57(3):213-236.
45. Bobrovnik S. A. New capabilities in determining the binding parameters for ligand-receptor interaction. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2005;65(1):30-44.
46. Bobrovnik S. A. Avidity of polyreactive immunoglobulins. *Ukr. Biochem. J.* 2014;86(6):183-189. (In Russian).
47. Dimitrov J. D., Planchais C., Roumenina L. T., Vassilev T. L., Kaveri S. V., Lacroix-Desmazes S. Antibody polyreactivity in health and disease: statu variabilis. *J. Immunol.* 2013;191(3):993-999.
48. Bobrovnik S. A., Demchenko M. A., Komisarenko S. V. Interaction peculiarities of polyreactive immunoglobulins and various antigens. *Ukr. Biochem. J.* 2014;86(1):68-74. (In Russian).
49. Buckley C. E. 3rd, Dorsey F. C. The effect of aging on human serum immunoglobulin concentrations. *J. Immunol.* 1970;105(4):964-972.
50. Cassidy J. T., Nordby G. L., Dodge H. J. Biologic variation of human serum immunoglobulin concentrations: sex-age specific effects. *J. Chronic. Dis.* 1974;27(11-12):507-516.
51. Stoica G., Macarie E., Michiu V., Stoica R. C. Biologic variation of human immunoglobulin concentration. I. Sex-age specific effects on serum levels of IgG, IgA, IgM and IgD. *Med. Interne.* 1980;18(3):323-332.

Получено 19.02.2015