

МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

УДК 577.27

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ДОСТИЖЕНИЕМ РАВНОВЕСИЯ РЕАКЦИИ АНТИГЕН–АНТИТЕЛО И ТОЧНОСТЬЮ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФФИННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

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

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

Проведены теоретические исследования зависимости точности экспериментального определения аффинности взаимодействия антител с антигеном от степени достижения динамического равновесия. Показано, что измерение концентрации реагентов в момент, когда равновесие рассматриваемой реакции еще не достигнуто, приводит к снижению точности оценки аффинности реакции. Установлено, что для большинства антител, в смеси с соответствующим антигеном, динамическое равновесие в реакции антиген–антитело наступает через 2–4 часа после начала реакции.

Ключевые слова: реакция антиген–антитело; аффинность; динамическое равновесие.

Аффинность взаимодействия двух и более молекул можно определять различными методами. Одним из наиболее распространенных и простых методов является метод, основанный на измерении концентрации образовавшихся комплексов молекул и концентрации этих молекул, не связанных друг с другом. В этом случае, согласно определению, константой равновесия (K), являющейся мерой аффинности реакции взаимодействия двух молекул A и B , является отношение концентрации комплекса исследуемых молекул (c), к произведению концентраций свободных молекул, т.е. $K = c/(a \times b)$, причем значения концентраций a , b и c должны быть найдены после достижения динамического равновесия между комплексом и свободными молекулами. Таким образом, для того, чтобы определить аффинность взаимодействия двух молекул достаточно определить концентрацию свободных молекул и их комплекса после достижения равновесия в системе, а затем выполнить простые арифметические действия.

Целью настоящей работы является теоретическое исследование вопроса о том, как точность измерения константы равновесия зависит от того, насколько полно достигнуто равновесие в исследуемой реакции, а также как быстро достигается динамическое равновесие в реакции связывания антител с соответствующим

антигеном в зависимости от концентрации взаимодействующих веществ и константы скорости прямой и обратной реакции. В частности, сделаны расчеты времени реакции для обратимого взаимодействия антител с соответствующим антигеном.

Результаты и обсуждение

В статье, описывающей метод определения аффинности антител [1], Фриге и соавт. (1985) предположили, что для достижения состояния равновесия в смеси антиген–антитело следует инкубировать эту смесь около суток. Вследствие этого, все экспериментаторы, которые использовали упомянутую методику или же ей подобные, включая и автора настоящей статьи [2–6], также инкубировали смесь антиген–антитело в течение суток, после чего ее вносили в лунки микроплат с сорбированным антигеном для того, чтобы определить оставшуюся часть антител, незаблокированных антигеном в состоянии равновесия. Возникает вопрос, действительно ли в данной системе за сутки достигается равновесие? С другой стороны, в том случае, если равновесие все еще не достигнуто, то как это отражается на точности измерения аффинности антител? Иными словами, есть ли необходимость инкубировать смесь антиген–антитело целые сутки или же

равновесие может быть достигнуто в течение нескольких часов или даже минут?

Чтобы ответить на эти вопросы следует произвести необходимые вычисления, которые дадут исчерпывающие ответы. Для этого рассмотрим некую обратимую реакцию, в которой рецептор А обратимо связывает лиганд В (причем концентрация лиганда значительно превышает концентрацию рецептора А), в результате чего образуется комплекс С:



Константа аффинности взаимодействия реагентов А и В равна отношению константы скорости (К) прямой и обратной реакции или же отношению концентрации комплекса С к произведению концентраций А и В:

$$K = \frac{c}{(a_0 - c) \times (b_0 - c)}, \quad (2)$$

где a_0 и b_0 — исходные концентрации веществ А и В (например, концентрация рецептора и лиганда); c — концентрация их комплекса С.

Для того, чтобы упростить уравнение (2) и значительно упростить расчеты в экспериментальной работе, обычно подобные реакции изучают при избытке одного из компонентов реакции, например реагента В. Такие реакции называются реакциями псевдопервого порядка, поскольку в ходе реакции практически не происходит изменения концентрации компонента, взятого в избытке. Напомним также, что упомянутые выше уравнения Фриге и соавт., предложенные для оценки аффинности антител были получены авторами для случая, когда концентрация антигена значительно превышала концентрацию антител.

В том случае, когда концентрация лиганда намного превышает концентрацию рецептора, т.е. $b_0 \gg a$, и поскольку $c \leq a$, очевидно, что $b_0 \gg c$. Значит $(b_0 - c) \sim b_0$, поэтому, уравнение (2) можно упростить:

$$K = \frac{c}{b_0(a_0 - c)}. \quad (3)$$

Из уравнения (3) следует, что если в эксперименте измерения величины c будут сделаны ранее того времени, когда практически достигнуто равновесие в реакции, то найденное значение концентрации комплекса будет меньше, величина $a_0 - c$ будет больше истинного значения, а найденное значение K будет меньше истинного значения. Продемонстрируем это на следующем примере.

Пусть молекулы двух веществ А и В обратимо образуют комплекс С и аффинность это-

го взаимодействия равна $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Тогда при концентрации $a_0 = 1 \times 10^{-10} \text{ M}$ и $b_0 = 4 \times 10^{-8} \text{ M}$ концентрация комплекса после достижения равновесия будет равна $8 \times 10^{-11} \text{ M}$. Представим себе, что в эксперименте величину c определили раньше, чем в реакции было достигнуто динамическое равновесие, и значение c было равно 90 или 95% ее истинной величины, т.е. $7,2 \times 10^{-11}$ и $7,6 \times 10^{-11} \text{ M}$ соответственно. Тогда, зная величины a_0 и b_0 , с помощью уравнения (3) можно легко вычислить, что найденные значения K для этих случаев будут соответственно равны $6,43 \times 10^7$ и $7,92 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ вместо истинной величины аффинности, равной $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Следовательно, снижение точности измерения концентрации комплекса лиганд–рецептор приводит к двукратному снижению точности определения константы равновесия. Это указывает на то, что в подобных экспериментах измерения необходимо делать тогда, когда динамическое равновесие в системе практически достигнуто.

В связи с вышеизложенным, целесообразно рассмотреть, как быстро достигается состояние равновесия для реакций, описываемых уравнением (1) в зависимости от величин a_0 и b_0 , а также от значений констант скорости реакции. Чтобы сделать это, необходимо рассмотреть динамику данной реакции и определить ее зависимость от указанных параметров реакции.

Динамика обратимой реакции (1) описывается следующим дифференциальным уравнением (при условии, что $b \gg a$ и, следовательно, концентрация В практически не изменяется с течением реакции, оставаясь равной исходному значению b_0):

$$\frac{da}{dt} = -k_1 b_0 a + k_2 c. \quad (4)$$

Решение этого дифференциального уравнения при начальных условиях $t = 0, c = 0, a = a_0$ дает следующее алгебраическое выражение зависимости величины a от времени и констант скорости k_1 и k_2 :

$$a = \frac{a_0}{k_1 b_0 + k_2} \left\{ k_2 + k_1 b_0 e^{-(k_1 b_0 + k_2)t} \right\}. \quad (5)$$

Используя это выражение легко рассчитать динамику изменения величины a с течением времени и определить скорость достижения равновесия в зависимости от значений a_0, b_0, k_1 и k_2 . На рис. 1 представлена такая теоретическая кривая динамики реакции для произвольно выбранных значений $a_0 = 1 \times 10^{-10} \text{ M}$,

$b_0 = 1 \times 10^{-8}$ М, $k_1 = 1 \times 10^3$ М⁻¹·с⁻¹, $k_2 = 1 \times 10^{-5}$ с⁻¹.
 Как видно, для выбранных параметров реакции связывания веществ А и В состояние динамического равновесия достигается примерно через 100 ч, т.е. более чем через четверо суток.

Поскольку при определении аффинности антител обычно используют ряд различных концентраций антигена, необходимо рассмотреть, влияет ли и если да, то как именно влияют на скорость достижения состояния равновесия исходные концентрации реагирующих веществ. На рис. 2 представлены три различные кривые динамики рассматриваемой реакции в зависимости от величины исходной концентрации вещества В, тогда как исходная концентрация А является постоянной. Изменение значений концентрации реагента А с течением времени представлено на рис. 2 как часть от исходного значения величины А.

Как видно из рисунка, время достижения равновесия в значительной степени зависит от исходной концентрации взаимодействующих веществ, причем, чем выше исходные концентрации реагента (в данном случае вещества В), тем быстрее достигается равновесие. Так, при исходной концентрации вещества В, равной 1×10^{-9} М, равновесие реакции не достигается даже за 240 ч, т.е. не достигается более чем за 10 суток. Если $b = 1 \times 10^{-8}$ М, то равновесие достигается примерно через 75–80 ч после начала реакции. И, наконец, если $b = 1 \times 10^{-7}$ М, то равновесие достигается примерно через сутки. Таким образом, с ростом концентрации взаимодействующих веществ, скорость достижения равновесия заметно увеличивается, а время реакции соответственно уменьшается.

Теперь рассмотрим, каким образом изменится время достижения равновесия в реакции в зависимости от величины аффинности взаимодействия А и В, а также от значений констант скорости прямой и обратной реакции — k_1 и k_2 . Вначале рассмотрим как влияют величины k_1 и k_2 на скорость достижения равновесия. Очевидно, что с увеличением значения k_1 скорость реакции возрастает, и, следовательно, время достижения равновесия должно уменьшаться. Об этом свидетельствуют и расчеты, проведенные с помощью уравнения (5) и представленные на рис. 3. Так, если при постоянных значениях $k_2 = 1 \times 10^{-5}$ с⁻¹, $a = 1 \times 10^{-10}$ М, $b_0 = 1 \times 10^{-8}$ М, значение k_1 увеличивается в три раза, например с $k_1 = 1 \times 10^3$ М⁻¹·с⁻¹ до $k_1 = 3 \times 10^3$ М⁻¹·с⁻¹, тогда время достижения равновесия уменьшается в 2,5 раза (от 100 до 40 ч). Если значение k_1 увеличивается до 1×10^4 М⁻¹·с⁻¹, то при неизменных остальных параметрах реакции равновесие достигается примерно через 15 ч.

Значение k_2 также влияет на скорость достижения равновесия. На рис. 4 представлены кривые динамики реакции для трех разных значений k_2 при одинаковых остальных параметрах рассматриваемой реакции. Как видно из рисунка, уменьшение значений k_2 приводит к более медленному достижению состояния равновесия, причем концентрация образовавшегося комплекса при этом заметно увеличивается. Так, при $k_2 = 1 \times 10^{-4}$ с⁻¹ равновесие достигается примерно через 8 ч, при $k_2 = 1 \times 10^{-5}$ с⁻¹ — примерно через 80 ч, а при $k_2 = 1 \times 10^{-6}$ с⁻¹ — через 200 ч после начала реакции.

Таким образом, все параметры бимолекулярного взаимодействия влияют на скорость

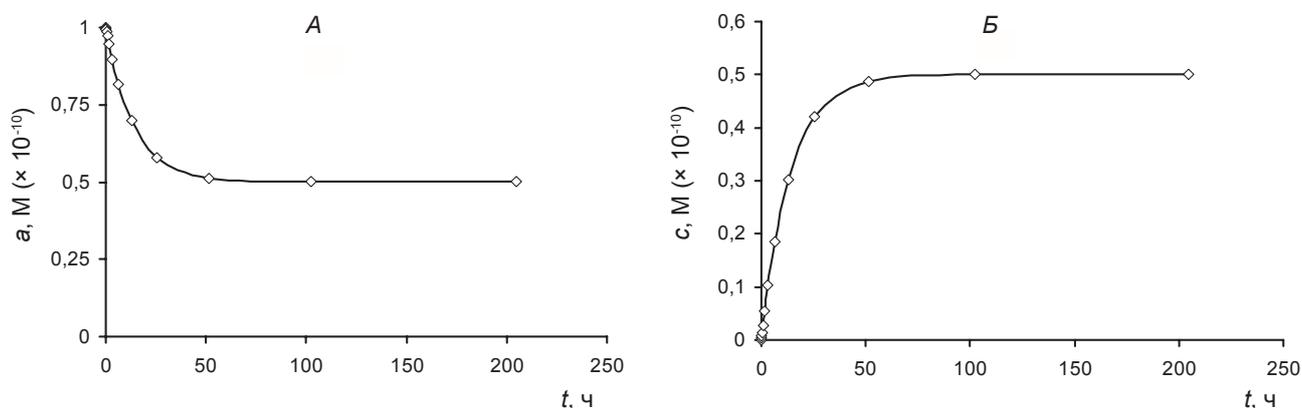


Рис. 1. Динамика обратимого связывания реагентов А и В и образования комплекса С: А — динамика снижения концентрации свободного вещества А; Б — динамика увеличения концентрации комплекса С. Для расчета взяты следующие значения параметров реакции: $a_0 = 1 \cdot 10^{-10}$ М, $b_0 = 1 \cdot 10^{-8}$ М, $k_1 = 1 \times 10^3$ М⁻¹·с⁻¹, $k_2 = 1 \times 10^{-5}$ с⁻¹

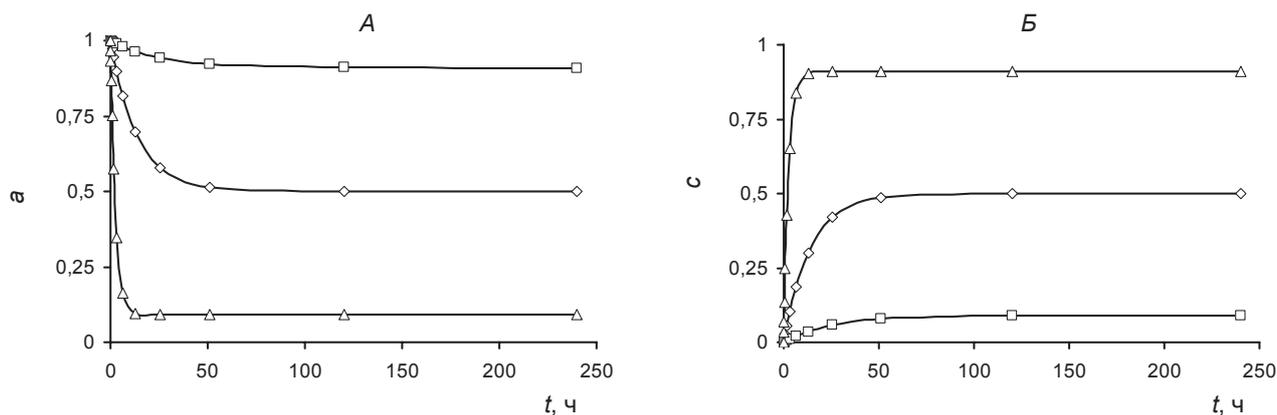


Рис. 2. Зависимость скорости достижения равновесия реакции обратимого связывания веществ А и В от концентрации одного из взаимодействующих компонентов. Для расчета взяты следующие значения параметров реакции: $k_1 = 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, $k_2 = 1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$. Исходная концентрация вещества А для всех трех реакций равна $a = 1 \times 10^{-10} \text{ M}$, исходные концентрации вещества В были следующими: $-\square-\square-\square-$ $b_0 = 1 \times 10^{-9} \text{ M}$; $-\diamond-\diamond-\diamond-$ $b_0 = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$; $-\Delta-\Delta-\Delta-$ $b_0 = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$

достижения состояния динамического равновесия реакции. Теперь рассмотрим, какова скорость достижения равновесия для реакции взаимодействия антител с антигеном при концентрациях антител и антигена, обычно используемых в экспериментах по оценке аффинности антител традиционными методами. Согласно нашим оценкам, концентрация антител в подобных опытах находится в пределах $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-9} \text{ M}$, а концентрация антигена обычно варьирует от 1×10^{-9} до $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (если аффинность антител близка к $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$). Если же аффинность значительно отличается от указанной выше, то должны заметно отличаться и концентрации антигена, используемого

для конкурентного ингибирования антител в соответствующих экспериментах. Продемонстрируем это следующим образом.

Согласно уравнению (3),

$$K_d = \frac{b_0(a_0 - c)}{c}, \quad (6)$$

где K_d – константа диссоциации, которая является обратной величиной константы аффинности K и ее размерность выражается в молях.

Тогда

$$c = \frac{a_0 b_0}{K_d + b_0}. \quad (7)$$

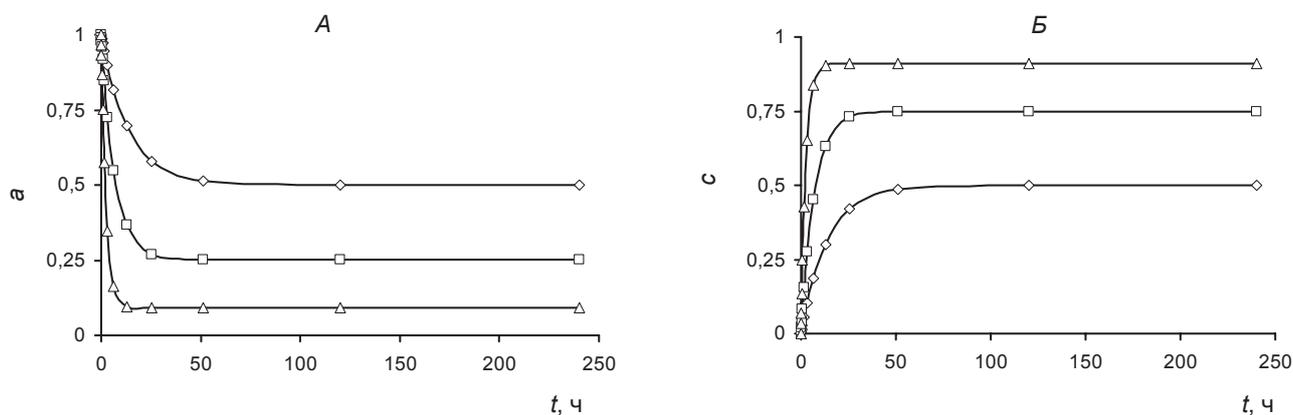


Рис. 3. Зависимость скорости достижения динамического равновесия для реакции обратимого связывания веществ А и В от константы скорости прямой реакции k_1 : $-\diamond-\diamond-\diamond-$ $k_1 = 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, $-\square-\square-\square-$ $k_1 = 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$, $-\Delta-\Delta-\Delta-$ $k_1 = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$. Для расчета динамики рассматриваемой реакции взяты следующие исходные концентрации веществ А и В: $a_0 = 1 \times 10^{-10} \text{ M}$, $b_0 = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$, значение константы скорости диссоциации $k_2 = 1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$

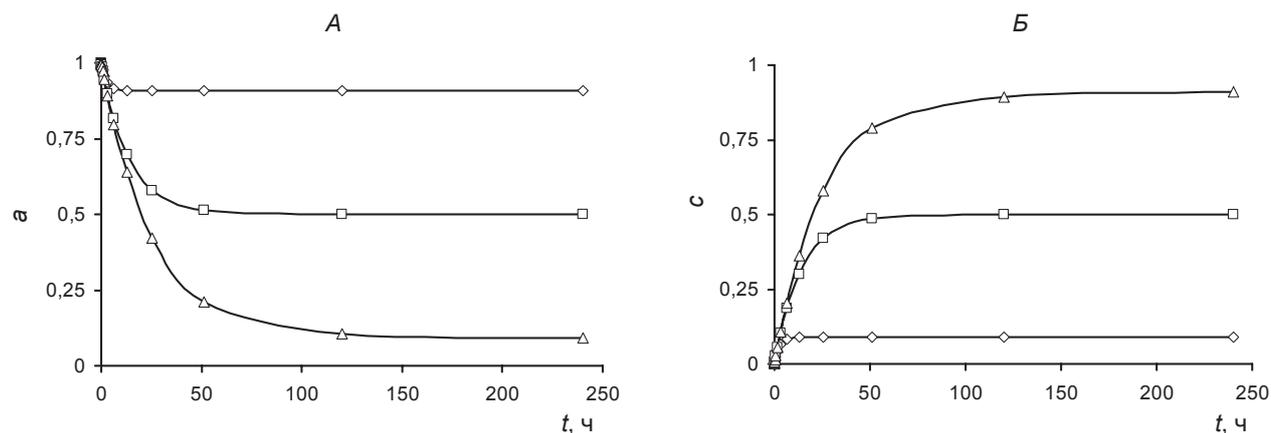


Рис. 4. Зависимость скорости достижения динамического равновесия для реакции обратимого связывания веществ А и В от константы скорости обратной реакции k_2 : $-\diamond-\diamond-\diamond-$ $k_2 = 1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $-\square-\square-\square-$ $k_2 = 1 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, $-\Delta-\Delta-\Delta-$ $k_2 = 1 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$. Для расчета кинетических кривых рассматриваемой реакции взяты следующие исходные концентрации веществ А и В: $a_0 = 1 \times 10^{-10} \text{ М}$, $b_0 = 1 \times 10^{-8} \text{ М}$, константа скорости ассоциации $k_1 = 1 \times 10^3 \text{ М}^{-1} \times \text{с}^{-1}$

Разделим обе части уравнения (7) на величину a_0 и получим:

$$\frac{c}{a_0} = \frac{b_0}{K_d + b_0}. \quad (8)$$

Слева в уравнении (8) представлено отношение концентрации образовавшегося комплекса к полной концентрации рецептора, т.е. это часть рецепторов, находящихся в комплексе с лигандом. Очевидно, что эксперименты удобнее всего проводить при таких концентрациях лиганда, когда он связан приблизительно с половиной рецепторов, а вторая половина рецепторов свободна. Если же в состоянии равновесия почти все рецепторы связаны с лигандом или наоборот, практически все рецепторы свободны, то выполнять измерения зависимости степени образования комплекса от концентрации лиганда будет сложно, а точность измерений будет невысокой.

Как видно из уравнения (8), ситуация, когда лиганд будет связан примерно с половиной рецепторов, происходит, если $K_d \approx b_0$, тогда $b_0 / (b_0 + b_0) = 0,5$. В том случае, если $K_d \ll b_0$, то указанное отношение приближается к единице, т.е. почти все рецепторы будут заблокированы лигандом. И наоборот, если $K_d \gg b_0$, то данное отношение будет близко к нулю, т.е. почти все рецепторы будут свободными. Следовательно, измерения концентрации свободных или связанных с лигандом рецепторов желательно проводить при концентрациях лиганда, близких к величине K_d , т.е. концентрации лиганда, примерно равной обратной величине аффинности взаимодействия K .

Учитывая вышеизложенное, исследования зависимости времени достижения равновесия реакции от констант скорости прямой и обратной реакции были рассчитаны нами для концентраций антигена, равных K_d , т.е. для концентраций, равных обратным величинам аффинности взаимодействия. Реальные значения констант скорости прямой и обратной реакции k_1 и k_2 для реакции антиген–антитело были взяты нами из литературы [7–11]. В таблице приведены значения времени реакции, когда рассматриваемая реакция антиген–антитело завершилась, по крайней мере, на 99,99%.

Как видно из таблицы, реакция антиген–антитело, как правило, практически завершается за 120–240 мин (т.е. за 2–4 ч) для тех случаев, когда аффинность взаимодействия была типична для высокоспецифичных антител. В некоторых случаях реакция (вариант №6) может завершиться всего за 5 мин, однако это происходит только при значительных концентрациях конкурирующего антигена, которые необходимо иногда использовать из-за чрезвычайно низкой аффинности взаимодействия. Отметим, что такая низкая аффинность, как в данном случае, не характерна для антител.

Следовательно, подводя итоги проведенным теоретическим расчетам, можно сделать вывод, что в большинстве случаев для равновесия реакции антиген–антитело при концентрациях антигена, приемлемых для оценки аффинности антител, реакция завершается через два часа после начала инкубации антител с антигеном. В некоторых случаях для завер-

Зависимость времени достижения равновесия от значений k_1 и k_2 , приведенных в литературе [7–11]. Все расчеты выполнены для концентрации антител $1,0 \times 10^{-10}$ М и концентрации антигена, равной обратной величине константы равновесия, т.е. для $b_0 = 1/K$ (М)

№	k_1 (М ⁻¹ ×с ⁻¹)	k_2 (с ⁻¹)	$K = k_1/k_2$ (М ⁻¹)	Время, мин	Ссылка
1	$4,1 \times 10^5$	$4,9 \times 10^{-4}$	$8,37 \times 10^8$	120	[7]
2	$6,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^{-4}$	$1,82 \times 10^{10}$	240	[8]
3	$9,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-4}$	$3,31 \times 10^{10}$	240	[8]
4	$4,21 \times 10^4$	$2,92 \times 10^{-3}$	$1,44 \times 10^7$	30	[9]
5	$7,19 \times 10^6$	$7,00 \times 10^{-4}$	$1,03 \times 10^8$	120	[9]
6	$1,0 \times 10^3$	$2,21 \times 10^{-2}$	$4,52 \times 10^4$	5	[10]
7	$3,7 \times 10^4$	$4,4 \times 10^{-3}$	$8,41 \times 10^6$	30	[10]
8	$2,59 \times 10^4$	$1,58 \times 10^{-4}$	$1,64 \times 10^8$	600	[11]
9	$1,83 \times 10^5$	$8,95 \times 10^{-4}$	$2,04 \times 10^7$	120	[11]

шения реакции требуется четыре часа инкубации. Более длительное или более короткое время реакции антиген–антитело встречается значительно реже.

Таким образом, рекомендованное Фриге и соавт. время инкубации смеси антител с антигеном, равное одним суткам, намного превышает длительность времени, необходимого для достижения равновесия. Очевидно, что в большинстве случаев время инкубации смеси антиген–антитело можно значительно сократить (до 2–4 ч) без малейшего ущерба для точности определения аффинности антител. Тем не менее, если исследователю совершенно неизвестны характеристики изучаемых антител, то в предварительных экспериментах время инкубации смеси антиген–антитело может быть увеличено до одних суток, как это и было ранее рекомендовано [1].

ВЗАЄМОВІДНОШЕННЯ МІЖ ДОСЯГНЕННЯМ РІВНОВАГИ В РЕАКЦІЇ АНТИГЕН–АНТИТІЛО І ТОЧНІСТЮ ВИЗНАЧЕННЯ АФІННОСТІ ВЗАЄМОДІЇ

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

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

Проведено теоретичні дослідження залежності точності експериментального визначення аффинності взаємодії антитіл з антигеном від ступеня досягнення динамічної рівноваги. Показано, що вимірювання концентрації реа-

гентів в момент відсутності рівноваги реакції призводить до зниження точності оцінки аффинності реакції. Встановлено, що для більшості антитіл в суміші з відповідним антигеном динамічна рівновага в реакції антиген–антитело настає через 2–4 години після початку реакції.

Ключові слова: реакція антиген–антитело, аффинність, динамічна рівновага.

RELATIONSHIP BETWEEN THE REACHING OF EQUILIBRIUM AND THE ACCURACY OF THE AFFINITY DETERMINATION FOR ANTIBODY- ANTIGEN REACTION

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

Summary

Theoretical investigation of the relationship between the reaching of equilibrium and the accuracy of the affinity determination for antibody-antigen reaction were carried out. It was shown that evaluation of the reagent concentrations before reaching the dynamic equilibrium leads to a decrease of estimation accuracy for the affinity constant of this reaction. We have established that for most of typical antibodies the dynamic equilibrium of their reaction with corresponding antigens comes 2-4 hours after the beginning.

Key words: antigen-antibody reaction, affinity, dynamic equilibrium.

1. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E.* // *J. Immunol. Methods.* – 1985. – **77**. – P. 305–319.
2. *Stevens F.* // *Molec. Immunol.* – 1987. – **24**. – P. 1055–1060.
3. *Bobrovnik S. A.* // *Укр. біохім. журн.* – 2000. – **72**, № 3. – P. 133–141.
4. *Bobrovnik S. A.* // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2003. – **57**. – P. 213–236.
5. *Bobrovnik S. A., Komisarenko S. V., Ilyina L. V.* // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 2. – С. 170–174.
6. *Stevens F. J., Bobrovnik S. A.* // *J. Immunol. Methods.* – 2007. – **328**. – P. 53–58.
7. *Берзофски Д. А., Берковер А. Дж.* / В кн. *Иммунология. Т.3.* Под ред. У. Пола, Москва: Мир, 1989. – С. 5–88.
8. *Hornick C. L., Karush F.* // *Immunochemistry.* – 1972. – **9**. – P. 325–340.
9. *Cauerhff A., Goldbaum F. A., Braden B. C.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – **101**. – P. 3539–3544.
10. *Manivel V., Bayiroglu F., Siddiqui Z. et al.* // *J. Immunol.* – 2002. – **169**. – P. 888–897.
11. *Ngundi M. M., Taitt C. R., Ligler F. S.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – **22**. – P. 124–130.

Получено 22.03.2010