

УДК 612.017.1:616-097:616.94:547.495:615

## **ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИРЕАКТИВНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С БЕЛКОВЫМИ И ГЛИКОЛИПИДНЫМИ АНТИГЕНАМИ**

**А.І. ГОРДІЕНКО, Н.В. ХИМИЧ, В.А. БЕЛОГЛАЗОВ**

Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского,

Известно, что иммуноглобулины (ИГ) играют важную роль в защите организма человека и животных от инфекции. Основная функция ИГ заключается в связывании самых различных антигенов за счет пространственной комплементарности антигенсвязывающих центров антител антигенным детерминантам соответствующих антигенов. Свой вклад в этот процесс вносят электростатические и Ван-дер-Ваальсовы силы, а также гидрофобные взаимодействия и водородные связи. По данным рентгеноструктурного анализа, антигенсвязывающий центр молекулы ИГ представляет собой полость, формируемую поверхностями контакта гипервариабельных участков легких и тяжелых цепей. Предполагается, что вся антигенсвязывающая область образует своего рода мозаику из сайтов связывания, взаимодействующих с различными антигennыми детерминантами [9].

Воздействие на сыворотку крови или ее иммуноглобулиновую фракцию различных физико-химических факторов (экстремально низкие либо высокие значения pH, обработка липазами, 4-10 М тиоцианатом калия, органическими растворителями, действие активных форм кислорода и др.) может приводить к полиреактивной трансформации ИГ, что проявляется в многократном усилении их взаимодействия с широким спектром антигенно неродственных антигенов [2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12]. Однако механизмы, лежащие в основе полиреактивной трансформации антител и взаимодействия полиреактивных иммуноглобулинов (ПРИГ) с антигennыми детерминантами, остаются недостаточно изученными. Предполагается, что трансформация нативных ИГ в ПРИГ сопровождается увеличением подвижности субдоменных структур центров связывания антител, что позволяет им легко изменять конформацию Fab-участков для подстройки под структуру различных антигенных эпитопов [2, 3, 4, 8, 9]. Не исключено, что полиреактивная трансформация обусловлена частичной денатурацией ИГ, которая приводит к появлению нового конформационного состояния белковой молекулы, в результате чего на поверхности антител экспонируется дополнительное количество гидрофобных сайтов, существенно повышающих вероятность неспецифического взаимодействия образующихся ПРИГ с

широким спектром антигенов [3, 4]. Кроме того, существует мнение, что в антигенсвязывающих центрах γ-глобулинов присутствуют сохранившиеся в ходе эволюции "предковые" сайты связывания, наличие которых и определяет сам феномен полиреактивности. Считается, что интактные ИГ, содержащие такие "предковые" полиреактивные сайты связывания, изначально находятся в функционально неактивном состоянии и проявляют свою реакционную способность только при определенных условиях, в частности, после кратковременного контакта с хаотропными ионами [11, 12].

Вопросам, посвященным изучению механизмов связывания специфических ИГ с антигенами уделялось достаточно много внимания, тогда как данные относительно особенностей взаимодействия ПРИГ с антигennыми структурами различной природы достаточно ограничены и зачастую противоречивы. В связи с этим целью данной работы являлось оценка возможного вклада электростатических и гидрофобных взаимодействий в связывание ПРИГ с некоторыми белковыми и гликолипидными антигенами.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Для проведения экспериментов использовали пулированную сыворотку 40 доноров Крымской республиканской станции переливания крови (г. Симферополь), которую получали общепринятым способом и хранили при +4-8°C в присутствии 0,1% азида натрия.

Иммуноглобулиновую фракцию выделяли четырехкратным осаждением 40%-м раствором сульфата аммония. Полученные ИГ трансформировали в ПРИГ кратковременной обработкой 3,5 М тиоцианатом калия, а также 1 М и 3,5 М мочевиной [6]. Концентрацию белка в исходной фракции ИГ, препаратах ПРИГ и ИГ, обработанных 1 М мочевиной (ИГ-1 М) и 3,5 М мочевиной ИГ-3,5 М), определяли биуретовым методом [13]. Во время всего периода выполнения экспериментов антитела хранили при +4-8°C в присутствии 0,1% азида натрия. Анализ взаимодействия исходной фракции ИГ, ПРИГ, ИГ-1 М и ИГ-3,5 М с бактериальными антигенами проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА) [5]. В качестве гликолипидных

антигенов использовали коммерческие препараты липополисахарида (ЛПС) энтеробактерий *Escherichia coli* K235, *Salmonella minnesota* и *Salmonella enteritidis*; антигеном белковой природы служил овальбумин (Ова) (Sigma Chem. Co., USA).

Спектры поглощения растворов ИГ и ПРИГ регистрировали с помощью спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Россия) в диапазоне длин волн 200 – 350 нм с шагом 10 нм. Для измерения интенсивности поглощения использовали стандартную кювету с толщиной слоя жидкости 10 мм. Исходную фракцию ИГ, ПРИГ, ИГ-1 М и ИГ-3,5 М предварительно разводили в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,4), содержащим 1%-й NaCl (PBS), до концентрации 0,2 мг/мл. Измерения проводили против PBS.

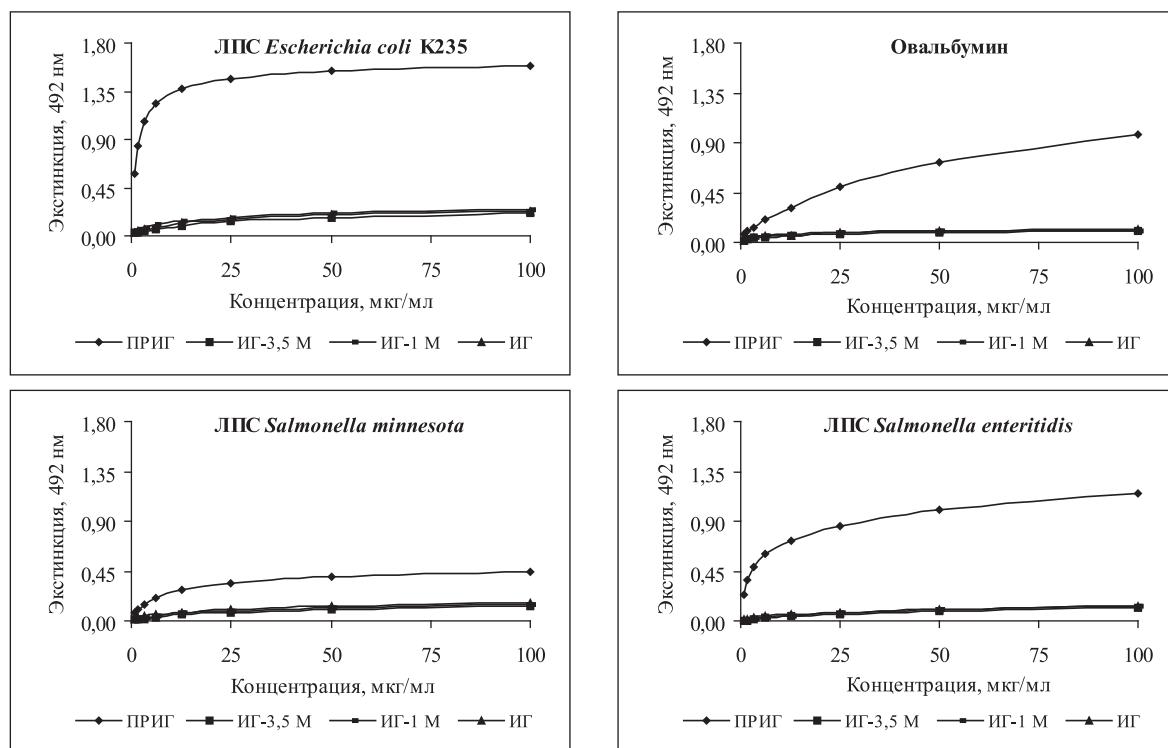
Вклад гидрофобных и электростатических взаимодействий в связывание ПРИГ и исходной фракции ИГ с ЛПС *Escherichia coli* K235 и Ова оценивали методом ТИФА [5], выполняя этап связывания {антитело-антитело} в PBS, содержащем различные концентрации неионного дегергента Tween-20 и хлорида натрия. Tween-20 и хлорид натрия предварительно разводили с 2-кратным шагом, начиная с концентрации соответственно 0,2% и 1 М. В качестве контроля использовали 0,01 М фосфатный буфер (рН 7,4), не содержащий указанные модификаторы. Высушивание Ова (10 мкг/мл) на поверхности

полистироловых планшетов проводили в течение 12–18 часов при 37°C.

Все исследования выполняли 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 3 параллельных опытов. При этом относительная величина стандартной ошибки не превышает 7% от среднего значения измеряемого показателя.

## РЕЗУЛЬТАТИ І ОБСУЖДЕННІ

В результате проведенных экспериментов установлено, что показатели, характеризующие интенсивность взаимодействия  $\gamma$ -глобулинов с ЛПС *E. coli* K235, *S. minnesota*, *S. enteritidis* и Ова после воздействия на них 1 М и 3,5 М мочевиной, практически не отличалась от таковых для нативных ИГ. В тоже время кратковременная обработка ИГ 3,5 М тиоцианатом калия приводит к полиреактивной трансформации антител, что проявляется в многократном усилении их взаимодействия с выше указанными антигенами. Так, при концентрации 100 мкг/мл связывание ПРИГ с ЛПС *E. coli* K235, *S. minnesota*, *S. enteritidis* и Ова возрастало соответственно в 6,8, 2,8, 8,6 и 8,8 раза по сравнению с аналогичными величинами показателей для нативных ИГ (Рис. 1)



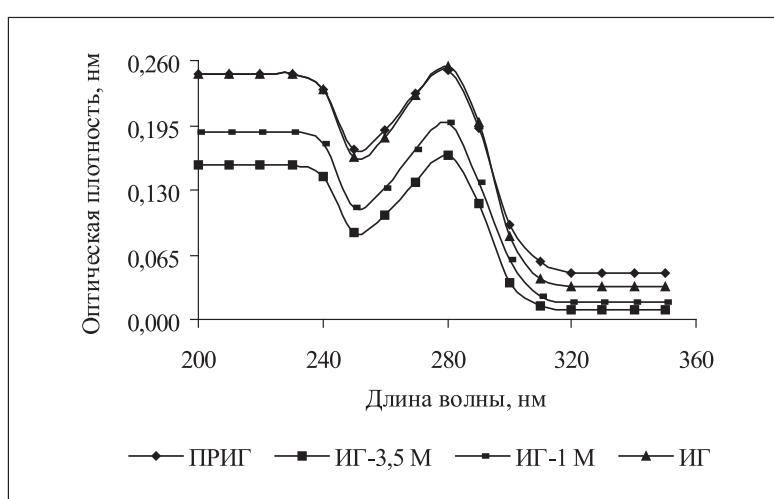
**Рис. 1. Влияние обработки нативных ИГ мочевиной и тиоцианатом калия на интенсивность их взаимодействия с белковыми и гликолипидными антигенами.**

ПРИГ – нативные ИГ, обработанные 3,5 М тиоцианатом калия; ИГ-1 М – нативные ИГ, обработанные 1 М мочевиной; ИГ-3,5 М – нативные ИГ, обработанные 3,5 М мочевиной.

При этом взаимодействие ПРИГ с антигенами имело разнонаправленный характер, что обусловлено, по всей видимости, наличием структурных различий между антигennыми детерминантами белковых и гликолипидных антигенов, а также между О-полисахаридными цепями ЛПС различных видов энтеробактерий [6].

Известно, что мочевина и ее производные в высоких концентрациях являются сильными денатурантами и вызывают глубокие конформационные перестройки белковых молекул, которые сопровождаются выраженным изменением их спектра поглощения в ультрафиолето-

вой области [1, 7]. В наших экспериментах непродолжительная (в течение 10 мин) обработка иммуноглобулиновой фракции 1 М и 3,5 М мочевиной сопровождалась значительным снижением показателей интенсивности поглощения в диапазоне длин волн 240 - 300 нм (в среднем соответственно в 1,4 и 1,8 раза) по сравнению с аналогичными значениями оптической плотности нативных ИГ. Однако такая же по времени инкубация нативных ИГ с 3,5 М тиоцианатом калия не приводила к изменениям их экстинкции в ультрафиолетовой области спектра (Рис. 2).



**Рис. 2. Влияние обработки нативных ИГ мочевиной и тиоцианатом калия на спектры поглощения в УФ-области в диапазоне длин волн 200 - 350 нм.**

Полученные нами данные спектральных исследований свидетельствуют о том, что воздействие на ИГ 1 М и 3,5 М мочевиной сопровождается полной или частичной потерей контакта хромофорных групп с окружающими их соседними группами в молекуле белка и к переходу их в окружение, создаваемое растворителем. В результате в водную среду высвобождается часть аминокислот и углеводов, локализованных в междоменной области  $\gamma$ -глобулина [1, 7]. В тоже время экспозиция антител с 3,5 М тиоцианатом калия не вызывает существенных изменений спектральных свойств их хромофорных групп. По всей видимости, обнаруженные различия в особенностях структурной пертурбации ИГ при взаимодействии с выше указанными дестабилизирующими факторами способны ощутимо влиять на их функциональные свойства.

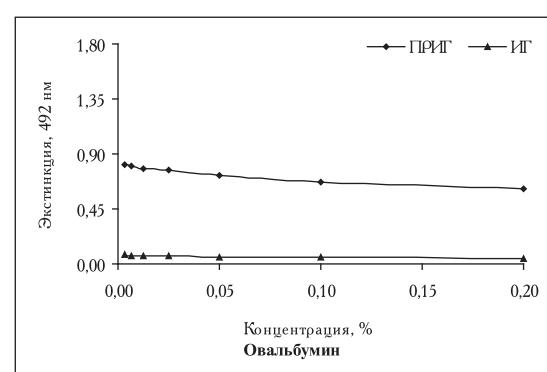
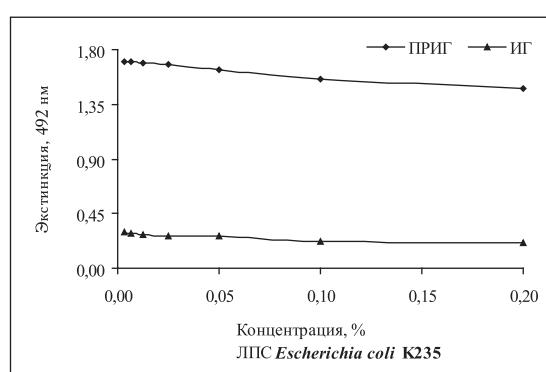
В литературе существует мнение, что трансформация нативных ИГ в ПРИГ сопровождается резким усилением роли гидрофобных взаимодействий в процессах межбелкового комплексообразования. Так, С.А. Бобровником было показано, что ПРИГ более эффективно реагируют с белковыми антигенами, иммобилизованными на поверхности твердой фазы путем

высушивания из аммоний-бикарбонатного буфера. Автор цитируемой работы связывает наблюдавшийся эффект с тем, что при высушивании нативная конформация белков-антител нарушается и на их поверхности появляются ранее экранированные гидрофобные сайты, что и обеспечивает формирование новых антигенных детерминант, распознаваемых ПРИГ [3, 4]. Полученные нами ранее данные свидетельствуют о том, что ИГ после инкубации с 3,5 М тиоцианатом калия действительно трансформируются в ПРИГ и приобретают повышенную способность к связыванию как с белковыми, так и с гликолипидными антигенами [6]. Однако поскольку все эксперименты по изучению взаимодействия ПРИГ с этими антигенами проводились в присутствии достаточно высокой концентрации нейонного детергента Tween-20 (0,05%), то вклад гидрофобных связей в реализацию механизмов взаимодействия ПРИГ с соответствующими лигандами представляется незначительным. В связи с этим одной из экспериментальных задач данной работы являлось более детальное рассмотрение факторов, способных влиять на связывание ПРИГ с белковыми и гликолипидными антигенами.

Вклад гидрофобных взаимодействий в связывание ПРИГ и нативных ИГ с ЛПС *E. coli* K235 и ОвА оценивали методом тИФА. При проведении данного эксперимента ЛПС *E. coli* K235 (10 мкг/мл) иммобилизовали по методу [5]; ОвА (10 мкг/мл) – сорбцией в течение 60 мин при 37°C из 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 1%-й NaCl (PBS). Для удаления неспецифически связавшихся компонентов и блокирования свободных центров связывания лунки промывали PBS, содержащим 0,05%-й Tween-20 (PBS-T). Для разведения ПРИГ и нативных ИГ использовали PBS, который содержал убывающие в геометрической прогрессии концентрации Tween-20 (от 0,2% до 0,003%). В лунки последовательно вносили по 100 мкл ПРИГ или нативных ИГ (100 мкг/мл) в PBS, со-

держащем различные концентрации Tween-20 и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. В качестве контроля использовали PBS. После отмычки неспецифически связавшихся компонентов в лунки вносили по 100 мкл коньюгата козьих аффинно очищенных антител к IgG человека с пероксидазой хрена (Sigma Chem. Co., разведение 1:4000) и снова инкубировали 60 мин при 37°C. Оценку ассоциированной с твердой фазой пероксидазной активности осуществляли, как описано в работе [5].

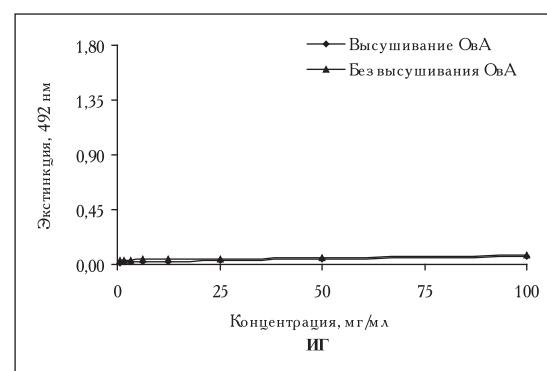
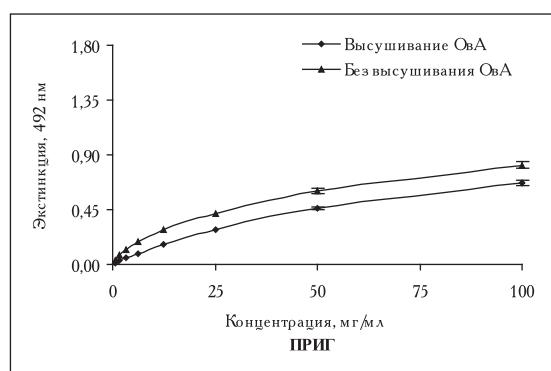
Проведенные эксперименты показали (Рис. 3), что взаимодействие ПРИГ и нативных ИГ с ЛПС *E. coli* K235 и ОвА практически не зависит от концентрации Tween-20 в инкубационной среде (ИС).



**Рис. 3. Влияние различных концентраций Tween-20 в инкубационной среде на взаимодействие ПРИГ и нативных ИГ с ЛПС *Escherichia coli* K235 и овальбумином.**

Наряду с этим в наших экспериментах было обнаружено, что уровень связывания ПРИГ с ОвА, иммобилизованным на поверхности твердой фазы путем высушивания, был заметно ниже (в среднем в 1,4 раза), чем с ОвА, не подвергшемуся после иммобилизации высушиванию, тогда как для нативных ИГ такой эффект практически отсутствовал (Рис. 4). При прове-

дении данного эксперимента ОвА иммобилизовали двумя различными способами: высушиванием 100 мкл раствора ОвА (10 мкг/мл) в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 12-18 часов при 37°C; и сорбцией ОвА (10 мкг/мл) из PBS в течение 60 мин при 37°C. Дальнейший ход анализа проводили, как описано выше.



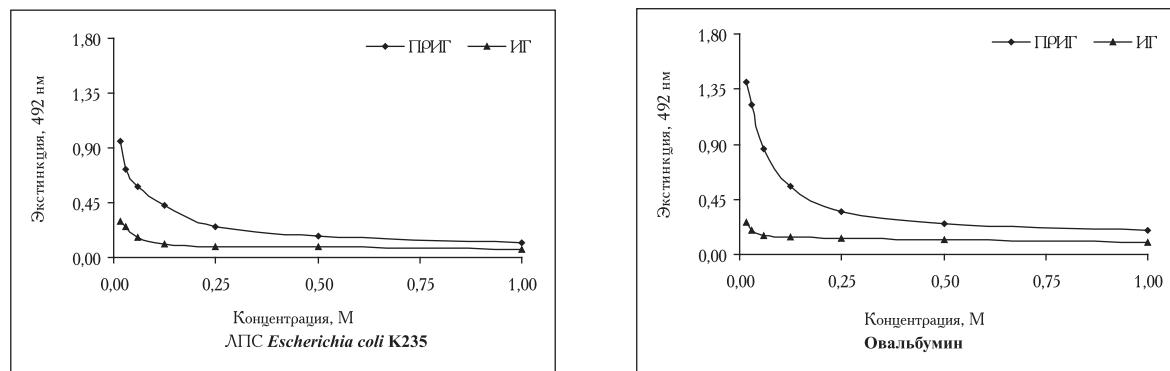
**Рис. 4. Особенности взаимодействия ПРИГ и нативных ИГ с овальбумином, иммобилизованным на поверхности твердой фазы путем высушивания при 37°C и сорбцией из буфера для иммобилизации без стадии высушивания.**

Так, при максимальной концентрации (100 мкг/мл) ПРИГ и нативных ИГ в ИС уровень связывания с ОвА, иммобилизованным на поверхности твердой фазы путем высушивания, был соответственно  $0,673 \pm 0,005$  и  $0,081 \pm 0,002$  усл. ед. оп. плотности; с ОвА, сорбированным из буфера для иммобилизации без стадии высушивания – соответственно  $0,917 \pm 0,006$  и  $0,092 \pm 0,002$  усл. ед. оп. плотности.

Возможный вклад электростатических взаимодействий в связывание ПРИГ и нативных ИГ с ЛПС *E. coli* K235 и ОвА также оценивали методом ТИФА по приведенной выше схеме, проводя стадию взаимодействия {антитело-антитело} при различной ионной силе ИС. Для разведения ПРИГ и нативных ИГ использовали PBS-T, который содержал убывающие в геометрической прогрессии концентрации NaCl (от 1 М до 0,02 М). Контролем служил PBS-T, не содержащий NaCl.

Проведенные эксперименты показали (Рис. 5), что взаимодействие ПРИГ и нативных ИГ с

ЛПС *E. coli* K235 и ОвА существенно зависит от концентрации NaCl в ИС. Так, при максимальной (1 М) концентрации NaCl в ИС связывание ПРИГ с ЛПС *E. coli* K235 и ОвА снижалось соответственно в 8,0 и 7,0 раза по сравнению с аналогичными значениями при минимальной (0,02 М) концентрации NaCl в ИС, и соответственно в 9,5 и 7,9 раза по отношению к величине данного показателя для ИС, не содержащей NaCl. Связывание нативных ИГ с ЛПС *E. coli* K235 и ОвА при максимальной (1 М) концентрации NaCl в ИС снижалось соответственно в 4,2 и 2,7 раза по сравнению с аналогичными значениями при минимальной (0,02 М) концентрации NaCl в ИС, и соответственно в 6,3 и 3,4 раза по отношению к величине данного показателя для ИС, не содержащей NaCl. При этом по сравнению с нативными ИГ концентрация NaCl в ИС влияет на уровень связывания ПРИГ с указанными антигенами в существенно большей степени, что, по-видимому, обусловлено более низкой аффинностью ПРИГ.



**Рис. 5. Влияние различных концентраций хлорида натрия в инкубационной среде на взаимодействие ПРИГ и нативных ИГ с ЛПС *Escherichia coli* K235 и овальбумином.**

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что механизмы, лежащие в основе феномена полиреактивной трансформации иммуноглобулинов, представляют собой гораздо более сложное явление, нежели простая денатурация молекул антител под воздействием того или иного дестабилизирующего фактора. При этом основной вклад в связывание полиреактивно трансформированных иммуноглобулинов с белковыми и гликолипидными антигенами вносят, по-видимому, электростатические взаимодействия, тогда как роль гидрофобных связей представляется менее значимой.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Атамась С.П., Тэтин С.Ю., Троицкий Г.В. Влияние мочевины низкой концентрации

на конформацию иммуноглобулинов по данным дифференциальной спектрофотометрии // Биофизика.– 1990.– 35, №1.– С. 36–38.

2. Бобровник С.А. Активация “молчащих” антител и их взаимодействие с антигенами // Укр. біохім. журн.– 1990.– 62, №5.– С. 87–89.
3. Бобровник С.А. Полиреактивные иммуноглобулины распознают гидрофобные участки белков // Укр. біохім. журн.– 2001.– 73, №2.– С. 116–122.
4. Бобровник С.А. Механизм взаимодействия полиреактивных иммуноглобулинов и белковых антигенов // Укр. біохім. журн.– 2002.– 74, №2 – С. 37–44.
5. Гордиенко А.И., Бакова А.А., Химич Н.В., Белоглазов В.А. Уровни естественных антител к липополисахаридам энтиробактерий

- у постоянных доноров республики Крым // Імунологія та алергологія.– 2003.– №4.– С. 31–36.
6. Гордиенко А.И., Химич Н.В. Хаотропно модифицированные иммуноглобулины по-разному взаимодействуют с белковыми и гликолипидными антигенами // Укр. біохім. журн.– 2006.– 78, №6.– С. 78–85.
7. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков.– Киев.: Наук. думка, 1981.– 208 с.
8. Малинка М.К., Петриев В.М., Подгородниченко В.К. Увеличение способности иммуноглобулинов, инкубированных при кислых значения pH, связывать отрицательно заряженные антигены // Иммунология.– 2007, №1.– С. 16–19.
9. Структура и функции антител / Под ред. Л. Глинна, М. Стьюарда. – Москва: Мир, 1983.– 200 с.
10. Химич Н.В., Гордиенко А.И. Влияние тиоцианата калия на взаимодействие иммуноглобулинов и сывороточного альбумина с белковыми и гликолипидными антигенами // Імунологія та алергологія.– 2008.– №3.– С. 50–54.
11. Ширяев Н.В. Эволюционное прошлое IgG млекопитающих в свете современных знаний о структуре и функционировании данной белковой молекулы // Иммунология.– 2006.– №1.– С. 58–60.
12. Bouvet J.P., Dighiero G. Polyreactivity is not an artefact // J. Immunol. Methods.– 2001.– 254, N1–2.– P. 199–201.
13. Yatzidis H. An improved biuret reagent // Clin. Chem.– 1977.– 23, N5.– P. 908.

## **РЕЗЮМЕ**

### **ВПЛИВ ДЕЯКИХ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ВЗАЄМОДІЮ ПОЛІРЕАКТИВНИХ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ З БІЛКОВИМИ І ГЛІКОЛІПІДНИМИ АНТИГЕНАМИ**

*A.I. Гордієнко, Н.В. Хіміч, В.О. Білоглазов*

Установлено, що обробка нативних імуноглобулінів (ІГ) 1 М і 3,5 М сечовиною не приводить до поліреактивної трансформації антитіл. Утежчасінкубація ІГ з 3,5 М тіоцианатом калію підсилює їхньої взаємодії з білковими (овальбумін) і гліколіпідними антигенами (ліполіпосахариди, ЛПС) ентеробактерій *Escherichia coli* K235, *Salmonella minnesota* та *Salmonella enteritidis*). Отримані експериментальні дані вказують на те, що основою для неспецифічної реакції зв'язування хаотропно модифікованих ІГ з вище зазначеними антигенами є електростатичні взаємодії, при цьому внесок гідрофобних зв'язків можна вважати мінімальним.

Ключові слова: поліреактивні імуноглобуліни, ліполіпосахариди, овальбумін, сечовина.

## **SUMMARY**

### **INFLUENCE OF SOME PHYSICAL-CHEMICAL FACTORS ON INTERACTION POLYREACTIVE IMMUNOGLOBULINS WITH PROTEINS AND GLICOLIPIDES**

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

Is established, that the processing native immunoglobulins (IG) 1 M and 3,5 M urea does not result in polyreactive transformation of antibodies. In too time, incubation IG with 3,5 M KSCN strengthens their interactions with proteins (ovalbumin) and glicolipides (lipopolysaccharides, LPS) enterobacteria *Escherichia coli* K235, *Salmonella minnesota* and *Salmonella enteritidis*). The received experimental data specify that a basis for not specific reaction of linkage chaotropically modified IG with the above specified antigens are the electrostatic interactions, thus it is possible to consider the contribution hydrophobic communications minimal.

**Key words:** polyreactive immunoglobulins, lipopolysaccharides, ovalbumine, urea.