

УДК 577.27

НЕДОСТАТКИ ТРАДИЦИОННОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФФИННОСТИ АНТИТЕЛ И ИХ УСТРАНЕНИЕ

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

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

Показано, что применение традиционного метода определения аффинности антител может привести к получению неточных результатов и далеко неполной информации об исследуемом образце антител, особенно если данный образец содержит два и более видов антител различной аффинности. Для решения подобной проблемы нами предложено использовать иной подход, который позволяет определить, что исследуемый образец содержит более одного типа антител разной аффинности. В случае обнаружения в исследуемом образце двух типов антител различной аффинности для их характеристики следует применять метод, разработанный нами ранее.

Ключевые слова: реакция антиген-антитело, аффинность, математическое моделирование.

Аффинность взаимодействия является одной из наиболее важных характеристик любого лиганд-рецепторного взаимодействия, в том числе взаимодействия антиген-антитело. В связи с этим для определения аффинности взаимодействия антиген-антитело разработаны различные методы, среди которых методы, основанные на применении ELISA, являются одними из самых простых и надежных, к тому же не требующих значительных количеств антител и антигена, а также их очистки. Одним из наиболее популярных методов определения аффинности антител является метод, первоначально предложенный Фриге и др. (1985), а впоследствии скорректированный Стивенсом (1987). Предложенный авторами процесс линеаризации кривых зависимости концентрации свободных антител в их смеси с антигеном от обратной концентрации последнего почти всегда дает возможность получить прямую линию, даже в том случае, когда фактически рассматриваемая взаимосвязь не является линейной.

Вместе с тем, получение в эксперименте кажущейся линейной зависимости служит для исследователя подтверждением того, что его эксперимент якобы выполнен верно и полученные экспериментальные результаты позволяют определить истинную аффинность взаимодействия. В этом и заключается ошибка, которую трудно заметить, используя традиционный метод определения аффинности антител. Нами обнаружено, что во многих случаях упомянутый подход не позволяет выявить тот факт, что в исследуемом образце антител

может находиться примесь антител низкой аффинности. Отметим, что присутствие таких антител сказывается на точности определения аффинности высокоаффинных антител. К тому же информация о присутствии подобных антител может быть существенной для характеристики биологических свойств данного образца антител.

В связи с вышеизложенным, весьма желательным является определение истинных характеристик исследуемых образцов антител, а не только приблизительная оценка аффинности высокоаффинных антител, как это позволяет осуществить традиционный метод, предложенный Фриге и др. и скорректированный Стивенсом. В настоящей статье рассмотрены примеры решения подобной проблемы с помощью использования уравнения, предложенного нами ранее для оценки аффинности двухвалентных антител при помощи ELISA [2]. Несмотря на то, что предложенное нами уравнение выглядит более сложным, чем традиционно используемое уравнение Стивенса, преимущества использования нашего подхода являются очевидными, поскольку он позволяет получить дополнительно важную информацию о свойствах характеризуемого образца антител. В настоящей статье приводятся как экспериментальные, так и теоретические данные, которые убедительно демонстрируют преимущества предложенного нами уравнения по сравнению с традиционным подходом, поскольку предложенный нами метод позволяет получить более точные характеристики, а также значительно больше информации о свойствах исследуемых образцов антител.

Теория

Согласно закону действия масс, между аффинностью взаимодействия двух реагентов, их концентрациями и концентрацией комплекса этих реагентов в реакционной смеси существует соотношение, описываемое следующим уравнением:

$$K = \frac{c}{(l-c)(nr_0-c)}, \quad (1)$$

где K – константа равновесия или аффинность взаимодействия, c – концентрация лиганд-рецепторного комплекса при достижении состояния равновесия между свободными и связанными реагентами, l – полная концентрация лиганда, r_0 – полная концентрация рецептора, n – валентность рецептора. Тогда $(l-c)$ – это концентрация свободного лиганда, а (nr_0-c) – это концентрация свободных сайтов рецептора.

Важно отметить, что если $l \gg c$, то уравнение (1) можно упростить и тогда получим:

$$K = \frac{c}{l(nr_0-c)}. \quad (2)$$

Для того чтобы между экспериментально измеряемыми величинами c и $f = l-c$ получить линейную зависимость, Клотц в 1946 году преобразовал уравнение (1) следующим образом [3]:

$$\frac{1}{c} = \frac{1}{nfK_a} + \frac{1}{n}. \quad (3)$$

Уравнение (3) получило название уравнение Клотца. Очевидно, что, построив данную линейную зависимость, используя найденные в опыте значения c и f , можно легко определить n , равное обратной величине отрезка, отсекаемого прямой на оси ординат. Значение K также легко найти, поскольку угол наклона полученной таким образом прямой равен обратной величине константы равновесия K , умноженной на обратную величину n .

Позднее Скетчард в 1949 г. [4], используя идею Клотца, предложил несколько иной вариант преобразования уравнения (1), а именно:

$$\frac{c}{f} = K(nr_0-c). \quad (4)$$

В уравнении (4), названном уравнением Скетчарда, представлена линейная зависимость между величинами c/f и c , тангенс угла наклона которой равен K . Следовательно, уравнение Скетчарда также позволяет легко

определить константу равновесия K , причем в некоторых случаях это уравнение даже более удобно в применении, чем уравнение Клотца, в частности, когда необходимо определить аффинность двух видов рецепторов, находящихся в смеси и имеющих разные аффинности. Отметим, что в обоих случаях для определения аффинности взаимодействия необходимо экспериментально определять концентрацию образовавшегося комплекса, а не концентрацию свободного рецептора или лиганда.

Для того, чтобы уравнения (3) и (4) можно было использовать для определения аффинности антител методом ELISA, определяя в эксперименте не концентрации комплекса антиген-антитело, а концентрации свободных антител в смеси с антигеном, Фриге и соавт. в 1985 г., преобразовали уравнения Клотца (3) и Скетчарда (4) следующим образом [5]:

$$\frac{A_0}{A_0-A_i} = 1 + \frac{K_d}{l_i} \quad (5)$$

$$\frac{A_0 - A_i}{A_0} \times \frac{1}{l_i} = \frac{1}{K_d} \times \left(1 - \frac{A_0 - A_i}{A_0}\right), \quad (6)$$

где K_d – константа диссоциации комплекса антиген-антитело, равная обратной величине константы равновесия, т.е. $K_d = 1/K$; A_0 и A_i представляют собой измеряемые методом ELISA окраски лунок, которые должны быть пропорциональны концентрации свободных антител в исследуемых растворах в отсутствие антигена (т.е. равна A_0 , при $l = 0$) или в присутствии антигена (т.е. равна A_i , при $l = l_i$) соответственно после достижения состояния равновесия реакции антиген-антитело.

Важно также отметить, что Фриге и соавт. [5] получили свои уравнения (5) и (6) при условии, что $l \gg c$ и, следовательно, $l - c \approx l$.

Нами было показано [2, 6], что Фриге и соавт. значительно усложнили проблему вывода предложенных ими уравнений (5) и (6). Не только полученные ими уравнения (5) и (6), но еще как минимум семь аналогичных уравнений можно получить значительно более простым путем, используя не уравнения Клотца (3) и Скетчарда (4), а исходное уравнение (2), представляющее собой закон действия масс. К примеру, используя уравнение (2), можно легко получить [6] следующее уравнение, которое является более простым и более удобным для работы, чем уравнения (5) и (6):

$$\frac{A_0}{A_i} = 1 + Kl_i. \quad (7)$$

Главное преимущество предложенного нами уравнения (7) в сравнении с уравнениями (5) и (6) состоит даже не в его простоте, а в том, что справа в уравнении (7) используется концентрация конкурирующего антигена l_i , а не ее обратная величина, как это было в уравнениях (5) и (6). Это важное преимущество уравнения (7), поскольку известно, что использование линейных зависимостей от обратных концентраций реагентов может привести к существенному снижению точности определения искомых величин.

Еще одним существенным недостатком уравнений (5) и (6) является то, что, как отметил позднее Стивенс [7], эти уравнения, строго говоря, математически не точны, как не является точным и уравнение (7), поскольку все эти уравнения не учитывают того, что IgG-антитела являются двухвалентными. Проблема состоит в том, что уравнения (5), (6), (7) описывают соотношение между количеством свободных и связанных с лигандом моновалентных рецепторов в смеси лиганда и рецептора. Следовательно, в случае с антителами эти уравнения описывают соотношения между концентрациями свободных и связавших антиген паратопов антител, а не молекул антител. Поскольку IgG-антитела являются двухвалентными, то в их смеси с антигеном существуют три варианта связанных с антигеном антител, а именно: 1) антитела, у которых оба паратопа свободны; 2) антитела, у которых один паратоп свободен, а второй блокирован антигеном; 3) антитела, у которых оба паратопа заняты антигеном (рис. 1).

Очевидно, что, используя ELISA, в эксперименте мы определяем не часть свободных паратопов антител в их смеси с антигеном, а ту часть антител, у которых свободны или один, или оба паратопа. Это связано с тем, что именно такие антитела способны связываться с сорбированным на плашке антигеном и, следовательно, именно они будут регистрированы в эксперименте, как «свободные» антитела. Очевидно, что часть свободных паратопов антител и часть антител, у которых хотя бы один паратоп свободен, не равны между собой, а значит, строго говоря, неверны и уравнения (5) и (6), предложенные Фриге и соавт. (1985).

Чтобы устранить эту неточность, Стивенс в 1987 г. предположил, что уравнение (5) будет верным, если из левой части уравнения вычислять корень квадратный [7]. Если это предположение Стивенса верно, тогда теоретические расчеты показывают, что данное изменение в уравнении (5) позволяет получать значения



Рис. 1. Двухвалентные антитела, которые находятся в смеси с антигеном, могут быть в одном из следующих состояний: (1) оба паратопа антитела свободны; (2) один из паратопов антитела может быть заблокирован антигеном, а второй быть свободным; (3) оба паратопа антитела могут быть заблокированы антигеном.

Связаться с антигеном, сорбированным на иммунологических платах, могут только антитела (1) или (2), у которых один или оба паратопа свободны и, следовательно, именно они будут выявлены с помощью ELISA, как «свободные» антитела

константы равновесия, которые примерно в два раза выше, чем при помощи исходного уравнения (5). К сожалению, Стивенс не представил строгого математического доказательства своего предположения. Позднее нами было найдено следующее решение этой проблемы.

Найти соотношение между концентрацией свободных паратопов (т.е. паратопов, не заблокированных антигеном) и концентрацией антител (рис. 1), у которых или один, или оба паратопа свободны, можно следующим образом. Пусть после достижения равновесия в смеси антиген-антитело концентрация паратопов, связавших антиген, равна c_i . Тогда концентрация свободных паратопов будет равна $r_0 - c_i$, где r_0 — полная концентрация паратопов в исследуемой смеси.

Следовательно, вероятность того, что данный паратоп антитела заблокирован антигеном, равна c_i/r_0 , а вероятность того, что он свободен, равна $1 - c_i/r_0 = (r_0 - c_i)/r_0$. В соответствии с биномиальным распределением, вероятность того, что оба паратопа двухвалентного антитела одновременно связали антиген, будет равна квадрату вероятности связывания антигена каждым из паратопов, т.е. равна c_i^2/r_0^2 . Отсюда следует, что вероятность того, что хотя бы один из паратопов антитела не связал антиген (т.е. антитело является «свободным»), будет равна $1 - c_i^2/r_0^2 = (r_0^2 - c_i^2)/r_0^2$.

Таким образом, отношение между концентрацией «свободных» антител в смеси с антигеном и концентрацией свободных парато-

пов будет равно $(r_0^2 - c_i^2)/r_0^2$: $(r_0 - c_i)/r_0 = (r_0 + c_i)/r_0$. Это значит, что концентрация «свободных» антител в смеси с антигеном превышает концентрацию свободных паратопов в $(r_0 + c_i)/r_0$ раз. Поскольку методом ELISA исследователи определяют не концентрации свободных паратопов, а концентрации «свободных» антител в образцах, то для учета этого факта значения A_i в уравнениях (5), (6) или (7) необходимо разделить на величину $(r_0 + c_i)/r_0$.

Следует обратить внимание, что значение $(r_0 + c_i)/r_0$ неудобно использовать для коррекции полученных ранее уравнений (5), (6) и (7), поскольку данное выражение содержит неизвестное для экспериментатора значение c_i , которое не содержится в этих уравнениях и величина которого не измеряется в эксперименте, а, значит, остается неизвестной. Чтобы обойти эту проблему, можно поступить следующим образом. Используя уравнение (2), можно получить,

$$c_i = \frac{r_0 K l_i}{1 + K l_i}, \quad (8)$$

откуда следует, что

$$\frac{r_0 + c_i}{r_0} = \frac{1 + 2K l_i}{1 + K l_i}. \quad (9)$$

Следовательно, в уравнениях (5), (6) или (7) значения A_i можно разделить не на трудно определяемую величину $(r_0 + c_i)/r_0$, а на равную ей величину $(1 + 2K l_i)/(1 + K l_i)$. В этом случае, к примеру, из уравнения (7) получим:

$$\frac{A_0(1 + 2K l_i)}{A_i(1 + K l_i)} = 1 + K l_i. \quad (10)$$

После простых алгебраических преобразований уравнения (10), получим квадратное уравнение относительно искомой величины K :

$$K^2 l_i^2 - 2K l_i \times \frac{A_0 - A_i}{A_i} - \frac{A_0 - A_i}{A_i} = 0. \quad (11)$$

Отметим, что точно такое же уравнение (11) будет получено и после соответствующих преобразований, т.е. деления A_i на величину $(1 + 2K l_i)/(1 + K l_i)$, уравнений (5) или (6). Решение уравнения (11) позволяет получить выражение, представляющее собой линейную зависимость между величиной алгебраического выражения, стоящего слева, и концентрацией антигена l_i , а именно:

$$\frac{A_0 - A_i}{A_i} + \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}} = K l_i. \quad (12)$$

Очевидно, что тангенс угла наклона этой линейной зависимости равен константе равновесия K и, следовательно, построив данную линейную зависимость, можно найти угол наклона, а значит, определить величину K , т.е. аффинность взаимодействия антител с антигеном.

Полученное нами уравнение (12) можно преобразовать так, чтобы получить уравнение, предложенное ранее Стивенсом (1987). Для этого умножим обе части уравнения (12) на

$$\frac{A_0 - A_i}{A_i} - \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}}$$

и тогда получим:

$$\begin{aligned} & \left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 - \left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 - \frac{A_0 - A_i}{A_i} = \\ & = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_i} - \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}}\right) \times K l_i. \quad (13) \end{aligned}$$

Отсюда следует, что

$$-\frac{A_0 - A_i}{A_i} = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_i} - \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}}\right) \times K l_i. \quad (14)$$

Теперь, разделив обе части уравнения (14) на величину $K l_i (A_0 - A_i)/A_i$, получим:

$$-\frac{1}{K l_i} = 1 - \sqrt{1 + \frac{A_i}{A_0 - A_i}}. \quad (15)$$

Заменив в уравнении (15) значение K на обратную ей величину K_d и выполнив арифметические действия под знаком корня, получим окончательное выражение:

$$\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}} = 1 + \frac{K_d}{l_i}. \quad (16)$$

Таким образом, предположение, высказанное ранее Стивенсом (1987), оказалось верным. Действительно, с целью учета двухвалентности антител, для коррекции уравнения (5), следует вычислять корень квадратный из левой части уравнения (5), т.е. использовать вместо уравнения (5) уравнение (16).

Как мы видим, уравнение (12) и уравнение (16) – это фактически одно и то же уравнение, просто представленное разными алгебраическими выражениями. Следовательно, можно ожидать, что для оценки аффинности двухвалентных антител в принципе можно использовать любое из них. При этом уравнение

(16) является более простым, чем уравнение (12) и по этой причине кажется более предпочтительным для использования. Однако на самом деле все оказывается далеко не так, поскольку в уравнении (16) рассматривается линейная зависимость величины, стоящей слева, от обратной концентрации антигена. Далее в настоящей статье будут продемонстрированы важные преимущества использования уравнения (12) в сравнении с уравнением (16).

К вышеизложенному добавим также, что более сложной задачей является проблема определения аффинности двух видов антител одной специфичности, находящихся в смеси. Тем не менее, эта задача ранее была решена нами [2] способом, сходным со способом Клотца-Ханстона, предложенных авторами для случая смеси двух рецепторов и одного лиганда [8]. Позднее нами был предложен иной, более простой и удобный метод, а главное более точный способ определения констант равновесия при помощи метода нелинейной регрессии [9, 10]. Строго говоря, метод нелинейной регрессии может быть применен и для оценки аффинности одного вида антител. Его суть состоит в следующем. Из уравнения (10) следует, что

$$A_i = \frac{A_{01}(1+2l_iK)}{(1+l_iK)^2}. \quad (17)$$

Следовательно, получив экспериментальную кривую зависимости A_i от концентрации конкурирующего антигена l_i , а затем при помощи метода нелинейной регрессии отыскав такое значение K , при котором экспериментальная кривая наилучшим способом совпадает с теоретической кривой, описываемой уравнением (17), мы получим искомое значение аффинности антител.

Ранее нами было показано, что в отличие от уравнений (12), (16) или (17), в которых представлены взаимоотношения между значениями K , l_i , A_0 и A_i для одного вида двухвалентных антител, взаимоотношения между этими параметрами связывания для двух видов двухвалентных антител с константами равновесия K_1 и K_2 представлено следующим уравнением:

$$A_i = \frac{A_{01}(1+2l_iK_1)}{(1+l_iK_1)^2} + \frac{A_{02}(1+2l_iK_2)}{(1+l_iK_2)^2}, \quad (18)$$

где A_{01} и A_{02} – окраски лунок, которые пропорциональны концентрациям соответствующего вида антител и полученные методом ELISA для случая, когда концентрация конкурирующего антигена в смеси с антителами равна

нулю. Подробный вывод уравнения (18) представлен нами ранее [2].

Таким образом, относительно простым и точным способом определения аффинности двух видов антител, находящихся в смеси, является следующий способ. Получив экспериментальную кривую зависимости A_i от концентрации конкурирующего антигена l_i , необходимо с помощью метода нелинейной регрессии подогнать ее к теоретической кривой, описываемой уравнением (18) и, следовательно, таким способом найти значения искомых величин K_1 , K_2 , A_{01} и A_{02} , которые наилучшим способом позволяют экспериментальной кривой совпасть с теоретической кривой. Это дает возможность определить не только аффинность обоих видов антител, т.е. значения K_1 и K_2 , но также и соотношение между концентрациями этих антител в исследуемом образце, которое равно величине соотношения между найденными величинами A_{01} и A_{02} .

Материалы и методы

В качестве антигена в настоящей работе использовали альбумин куриных яиц (овальбумин), а также бычий сывороточный альбумин (БСА). В качестве антител использовали мышинные моноклональные антитела (мАт) к яичному альбумину, а также меченую пероксидазой хрена козью антисыворотку к мышинным иммуноглобулинам IgG класса, которые являлись продуктом фирмы Sigma (США). Овальбумин иммобилизовали на плоскодонных 96-ячеечных иммунологических платах, инкубируя его раствор (30 мкг/мл) в 1%-м NH_4HCO_3 + 0,01%-м NaN_3 при 4 °С в течение 20–24 час. Непосредственно перед использованием плат раствор овальбумина удаляли, и платы трижды отмывали забуференным физиологическим раствором (рН 7,2) + 0,1%-й Твин 20 (ТБФ).

Чтобы определить разведение мАт, пригодное для проведения экспериментов, исходный (коммерческий) раствор мАт разводили сначала в 25 000 раз в ТБФ+1% БСА, затем последовательно делали разведения этого раствора в 2 раза в ТБФ + 1% БСА, вносили полученные образцы в лунки плат с иммобилизованным овальбумином и определяли зависимость количества связавшихся антител от степени разведения методом ELISA. Для экспериментов брали такое разведение мАт, при котором их дальнейшее разведение в два раза приводит к двукратному уменьшению окраски лунок, получаемых методом ELISA, иными словами, к двукратному уменьшению количества связав-

шихся с платой антител. В настоящих экспериментах таким разведением исходного пула коммерческих мАт, специфичных к овалбумину, было разведение 1 : 250 000 и выше.

1 микролитр исходного раствора коммерческих мАт смешивали с 1 мл сыворотки неиммунных мышей и полученную смесь использовали для определения аффинности связывания мышинных IgG-антител с овалбумином. Для этого полученную смесь мАт и сыворотки мыши разводили 1 : 125 в ТБФ + 1% БСА и к 0,2 мл полученного раствора добавляли 0,2 мл овалбумина различной концентрации, предварительно разведенного в ТБФ + 1% БСА. Таким образом, разведение мАт в смеси с разными концентрациями овалбумина было равно 1:250000. Этот образец антител смешивали 1 : 1 с образцами антигена различной концентрации. Максимальная концентрация овалбумина в этих образцах была равна $1,0 \times 10^{-6}$ М, а в последующих образцах концентрация овалбумина снижалась в 2, 4, 8 и т.д. раз. Контрольный образец антител не содержал овалбумина.

Полученные таким образом образцы смеси антител с антигеном инкубировали в течение ночи при комнатной температуре (для достижения равновесия в реакции антиген-антитело), на следующий день по 100 мкл каждого образца вносили в четырех повторностях в лунки плат с сорбированным овалбумином и инкубировали 1 час при непрерывном перемешивании. Затем плашку обрабатывали меченой пероксидазой хрена антисывороткой против IgG-мыши. В качестве субстрата для пероксидазы использовали смесь ортофенилендиамина и пероксида водорода. После развития окраски иммуноферментную реакцию останавливали, добавляя по 50 мкл 2 М серной кислоты на 1 лунку, образцы спектрофотометрировали и вычисляли среднее значение плотности окраски лунок для каждого образца, которая была пропорциональна концентрации «свободных» антител в исходных образцах смеси антител с антигеном.

Найденные усредненные экспериментальные значения A_0 и A_i (среднее из 3–4 измерений) использовали для вычисления значений

$$\frac{A_0 - A_i}{A_i} + \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}} \quad \text{или} \quad \sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}, \quad \text{кото-}$$

рые, в свою очередь, использовали для построения графиков зависимости этих величин от концентрации конкурирующего антигена

I_i или обратной величине $1/I_i$ в соответствии с уравнениями (12) и (16). Согласно представленной выше теории, в случае наличия в исследуемых образцах одного вида антител, получаемые графики должны быть представлены прямыми линиями, тангенс угла которых равен величине константы равновесия при использовании уравнения (12) или же обратной величине константы равновесия при использовании уравнения (16).

Чтобы определить величины K_1 , K_2 , A_{01} и A_{02} , которые наилучшим способом позволяют подогнать экспериментальную кривую зависимости A_i от концентрации конкурирующего антигена к теоретической кривой, описываемой уравнением (18), использовали компьютерную программу Origin 7.5. В случае определения аффинности одного вида антител в растворе, экспериментальную кривую сравнивали с теоретической кривой, описываемой уравнением (17).

Результаты и их обсуждение

На рис. 2, А представлены три различные зависимости значений A_i (пропорциональные концентрациям «свободных» антител в смесях с антигеном) от концентрации антигена. Образец антител № 1 содержал только мАт к овалбумину и антиген (овальбумин), а два других образца содержали смесь тех же мАт с сывороткой мыши и тот же антиген. Как видно из рисунка, во всех трех случаях получены типичные кривые снижения концентрации «свободных» антител с увеличением концентрации конкурирующего антигена в смеси. При сравнении этих кривых заметно, что в вариантах № 2 и № 3, где присутствовали сывороточные иммуноглобулины мыши, снижение кривых менее выражено при высоких концентрациях антигена, чем в варианте № 1, что может свидетельствовать о присутствии в образцах № 2 и № 3 низкоаффинных антител к овалбумину. Тем не менее, вид полученных экспериментальных кривых не позволяет сделать об этом однозначный вывод без проведения соответствующего анализа.

В табл. 1 представлены усредненные значения A_0 и A_i для этого эксперимента. Используя эти значения, построим вначале линейные зависимости значений $\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ от $1/I_i$ (рис. 2,

Б) в соответствии с уравнением (16). Такой метод, как правило, используется для определения аффинности антител методом ELISA с тех пор, как Стивенс [7] внес свои предло-

ження относительно коррекции уравнения, предложенного Фриге и соавт. [5]. Как видно из рис. 2, Б, все три полученные зависимости являются близкими к линейным, причем их углы наклона также близки между собой. Определив значения тангенсов углов наклона полученных прямых, находим, что аффинности исследуемых образцов антител № 1, № 2 и № 3, найденных при помощи уравнения (16), равны $5,98 \times 10^7$, $5,09 \times 10^7$ и $4,78 \times 10^7$ М⁻¹ соответственно. Никакой иной информации о данных образцах антител подобный анализ, являющийся традиционным, не позволяет получить.

А теперь, используя точно те же исходные экспериментальные данные A_i от l_i , представленные в таблице 1, построим в соответствии с уравнением (12) графики зависимости значе-

ний $\frac{A_0 - A_i}{A_i} + \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}}$ от l_i (рис. 2, В).

Как видим графики, полученные с помощью уравнения (12) для образцов № 2 и № 3, являются нелинейными, в отличие от графиков, полученных с помощью уравнения (16). Однако график для образца № 1, содержащего только мАт к овальбумину, является линейным как в координатах, соответствующих уравнению (16), так и в координатах уравнения (12). При этом аффинность антител в образце № 1, определенная с помощью уравнения (16), равна

Таблица 1. Зависимость экспериментальных значений A_i от концентрации конкурирующего антигена в смеси с исследуемыми образцами антител. № 1 – раствор мАт к овальбумину; № 2 и № 3 – два образца смеси мАт к овальбумину и сыворотки контрольных (неиммунных) мышей BALB/c

Концентрация антигена ($\times 10^{-8}$ М)	Значения A_i для трех образцов антител:		
	№ 1	№ 2	№ 3
0	2,37	2,32	2,43
0,781	2,17	2,15	2,26
1,56	1,82	1,89	2,07
3,13	1,37	1,56	1,77
6,25	0,89	1,34	1,45
12,5	0,53	1,09	1,19
25	0,29	0,92	1,03
50	0,16	0,81	0,92
100	0,078	0,71	0,81

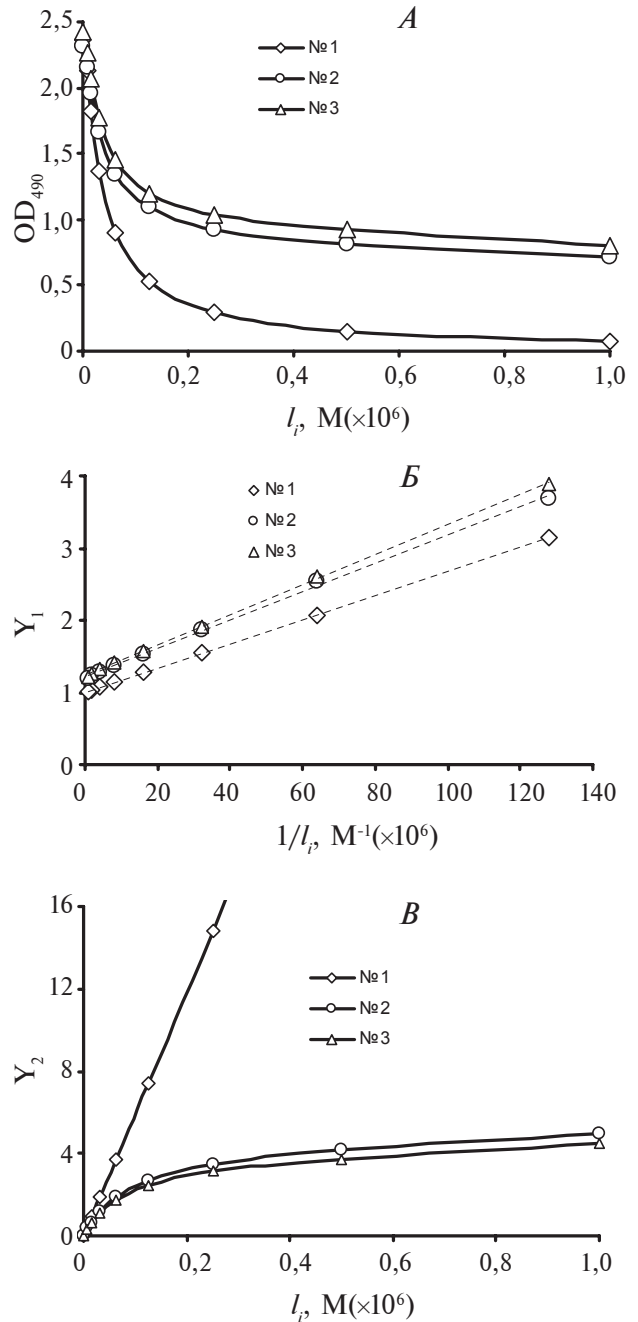


Рис. 2. А – Влияние концентрации конкурирующего антигена на количество «свободных» антител в их смеси с антигеном; Б – данные рис. 2, А, представлены в координатах $Y_1 = \sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$

против $1/l_i$ в соответствии с уравнением (16); В – данные рис. 2, А, представлены в координатах $Y_2 = \frac{A_0 - A_i}{A_i} + \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}}$ против l_i в соответствии с уравнением (12)

$5,81 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, т.е. близка к значению аффинности, определенному с помощью уравнения (16).

Нелинейность полученных графиков для образцов № 2 и № 3 указывает на то, что в данных образцах, по-видимому, имеются антитела по крайней мере двух видов, а, именно, высоко- и низкоаффинные антитела, специфичные к данному антигену. Чтобы определить аффинность обоих видов антител в данном образце, можно использовать предложенный нами ранее метод, основанный на применении метода нелинейной регрессии для подгонки полученных экспериментальных кривых к теоретической кривой, описываемой уравнением (17).

Зная, что образцы № 2 и № 3 содержат высоко- и низкоаффинные антитела, можно определить константы равновесия для обоих видов антител в исследуемых образцах, применив описанный нами ранее подход, основанный на использовании метода нелинейной регрессии для сравнения теоретической и экспериментальной кривой [9, 10]. Этот же подход можно применить и для оценки одного вида антител в образце № 1, однако в этом случае для определения аффинности реакции антиген-антитело нужно использовать уравнение (17), тогда как для оценки аффинности антител в образцах № 2 и № 3 необходимо использовать уравнение (18). Значения найденных таким способом параметров взаимодействия антител с антигеном для исследуемых образцов представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что константа равновесия для высокоаффинных антител во всех трех образцах примерно одинакова и близка к $6,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Это свидетельствует о том, что во всех трех случаях измерялась аффинность мАт, добавленных к мышинным сывороткам. Помимо этого, в образцах № 2 и № 3 обнаружены также низкоаффинные антитела, являющиеся, по-видимому, нормальными антителами к овальбумину, которые всегда присутствуют

в сыворотках животных и человека. Аффинность этих антител оказалась равной $5,80 \times 10^5$ и $5,86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Соотношение между концентрациями высоко- и низкоаффинных антител в исследуемых образцах можно также легко вычислить, как соотношение между найденными величинами A_{01} и A_{02} . Для образца № 2 оно равно 2,16, а для образца № 3 равно 1,86.

Несмотря на то, что проведенный нами анализ взаимодействия антител с антигеном и методов оценки параметров этого взаимодействия кажется логичным и убедительным, все же желательно получить бесспорные подтверждения правильности подобного анализа. Чтобы сделать это, проведем математическое моделирование реакции взаимодействия одного или двух видов антител с антигеном и, получив теоретические кривые зависимости концентрации «свободных» антител от концентрации конкурирующего антигена, затем используем три метода, рассмотренные выше, для определения аффинности взаимодействия антител с антигеном.

Теоретические значения A_i для одного вида антител или же для смеси двух антител разной аффинности при различных концентрациях конкурирующего антигена I_i можно легко вычислить, используя уравнения (17) и (18) соответственно. Найденные таким способом значения A_i представлены в табл. 3. Теперь, используя теоретические найденные значения A_i , можно легко определить, какие результаты дает применение каждого из упомянутых выше методов при отыскании параметров связывания антител с антигеном.

Вначале используем традиционный подход и уравнение (16), согласно которому должна быть линейная зависимость между величинами

$\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ и $1/I_i$ (рис. 3, Б). Как видно из рисунка,

Таблица 2. Значения параметров связывания овальбумина, найденные при помощи метода нелинейной регрессии для высоко- и низкоаффинных антител в трех исследуемых образцах

Параметры антител	Образцы:		
	№ 1	№ 2	№ 3
K_1	$(5,92 \pm 0,02) \times 10^7$	$(5,80 \pm 0,09) \times 10^7$	$(5,86 \pm 0,06) \times 10^7$
A_{01}	$2,37 \pm 0,003$	$1,58 \pm 0,01$	$1,58 \pm 0,05$
K_2	—	$(4,70 \pm 0,43) \times 10^5$	$(5,16 \pm 0,24) \times 10^6$
A_{02}	—	$0,73 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,05$
A_{01}/A_{02}	—	2,16	1,86

Таблиця 3. Теоретическі значення A_i для одного или двух видов антител, вычисленные по уравнениям [18]

Концентрация конкурирующего антигена, М ($\times 10^8$)	Значения A_i для одного вида антител	Значения A_i для двух видов антител
0	1	1,250
0,0625	0,997	1,247
0,125	0,988	1,238
0,25	0,960	1,210
0,5	0,889	1,139
1	0,750	1,000
2	0,556	0,805
4	0,360	0,610
8	0,210	0,459
16	0,114	0,359
32	0,060	0,295
64	0,031	0,242

Для расчета теоретических значений A_i были выбраны следующие параметры взаимодействия: $K_1 = 1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ и $K_2 = 1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, во второй колонке представлены значения A_i для случая, когда низкоаффинные антитела отсутствовали, а в третьей колонке представлены значения A_i для случая, когда предполагаемые образцы антител содержали $1,0 \times 10^{-10} \text{ M}$ высокоаффинных и $0,25 \times 10^{-10} \text{ M}$ низкоаффинных антител

как для варианта с одним видом антител, так и для смеси двух антител, аффинность которых различается на два порядка, использование уравнения (16) позволяет получить прямые линии, наклон которых незначительно отличается друг от друга. При этом константа равновесия для одного типа антител, вычисленная этим способом, равна $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, а для смеси антител найденная таким способом «усредненная» аффинность, равна $0,89 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Следовательно, в случае использования уравнения (16) можно определить аффинность только в том случае, когда имеется один вид антител. Присутствие в исследуемом образце низко- и высокоаффинных антител обнаружить не удастся. При этом значение «усредненной» константы равновесия является несколько заниженным по сравнению с истинной аффинностью высокоаффинных антител.

А теперь, используя теоретические данные таблицы 3, построим графики зависимости величин от I_i в соответствии с уравнением (12) (рис. 3, В). Как видно из рисунка, для образца, содержащего один вид антител мы опять получили линейную зависимость, тангенс угла которой равен $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Однако для теоретических значений A_i , представляющих собой образец смеси высоко- и низкоаффинных антител, получена выпуклая кривая, в точности

напоминающая экспериментальные кривые для смеси моноклональных антител с сывороткой мыши (рис. 2, В). Следовательно, применение уравнения (12) действительно позволяет выявить наличие смеси антител разной аффинности, тогда как традиционно используемое уравнение (16) не позволяет этого сделать.

Теперь, зная, что данный образец антител содержит высоко- и низкоаффинные антитела, их аффинность, а также соотношение их концентраций в исследуемом растворе можно определить с помощью метода нелинейной регрессии, сравнивая имеющуюся зависимость A_i от I_i с теоретической кривой, описываемой уравнением (18). Применение этого метода позволяет найти точно такие же значения K_1 , K_2 , A_{01} и A_{02} , какие были взяты нами для расчета теоретических значений A_i (табл. 3), а именно, $A_{01} = 1,0$; $K_1 = 1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$; $A_{02} = 0,25$; $K_2 = 1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Следовательно, нами продемонстрировано, что применение предложенного нами подхода, основанного на использовании уравнения (12) позволяет не только определить аффинность одного вида исследуемых антител, но в случае наличия двух типов антител в смеси (низко- и высокоаффинных) позволяет установить этот факт и, следовательно, попытаться найти аффинность обоих антител иными способами. К

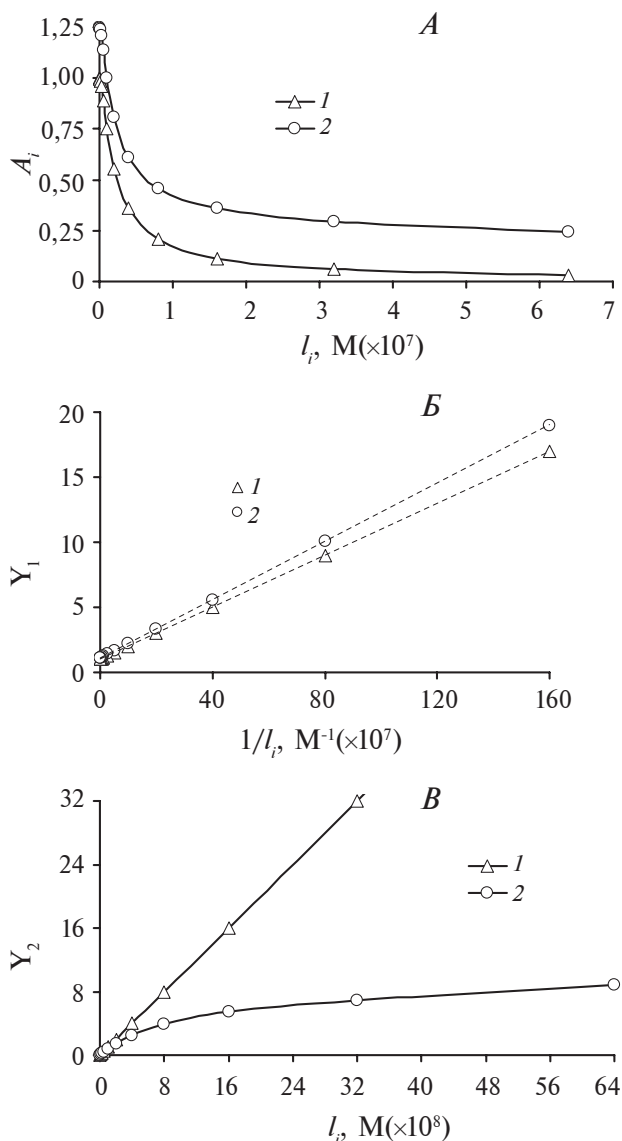


Рис. 3. А – Теоретические значения зависимости количества «свободных» антител в их смеси с антигеном от концентрации антигена; Б – данные рис. 2, А представлены в координатах

$Y_1 = \sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}}$ против $1/l_i$ в соответствии с уравнением (16); В – данные рис. 2, А представлены

в координатах $Y_2 = \frac{A_0 - A_i}{A_i} + \sqrt{\left(\frac{A_0 - A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{A_0 - A_i}{A_i}}$

против l_i в соответствии с уравнением (12)

примеру, получив с помощью уравнения (12) информацию о том, что исследуемый образец содержит низко- и высокоаффинные антитела, средство обоих видов антител к данному антигену, а также соотношение их концентраций

в исследуемом образце можно определить или при помощи метода нелинейной регрессии [9, 10], или же иным путем, например с помощью метода, описанного нами ранее [2].

НЕДОЛІКИ ТРАДИЦІЙНОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ АФІННОСТІ ТА ЇХ УСУНЕННЯ

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

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

Показано, що використання традиційного методу визначення афінності антитіл за допомогою ELISA може призвести до одержання неточних результатів і неповної інформації щодо досліджуваного зразка антитіл, особливо якщо досліджується суміш двох чи більше видів антитіл різної афінності. Для вирішення такої проблеми нами розроблено інший підхід. Він дозволяє визначити, що досліджуваний зразок антитіл має два чи більше типів антитіл різної афінності і, відповідно, вибрати метод для вимірювання цього параметра. Таким чином наш метод дозволяє визначити афінність двох і більше типів антитіл.

Ключові слова: реакція антиген-антитіло, афінність, математичне моделювання.

SHORTCOMINGS OF TRADITIONAL METHOD FOR DETERMINING AFFINITY AND THEIR REMOVAL

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

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

Summary

It was shown that application of the traditional method for antibody affinity determination may give not exact and non complete information about the characteristics of studied antibodies especially if studying specimens contain two or more species of antibodies with different affinity.

In order to avoid this problem it is recommended to use another approach, suggested by us earlier.

Our approach allows elucidating that studying specimens contain more than one kind of antibodies and this allows applying a proper method for an-

tibody affinity evaluation. Such method, which allows determining the affinity of two antibodies in a mixture that have different affinity, is also described.

Key words: antigen-antibody reaction, affinity, mathematical modeling.

1. *Bobrovnik S. A.* // Укр. біохім. журн. – 2000. – **72**, № 3. – С. 133–141.
2. *Bobrovnik S. A.* Determination of antibody affinity by ELISA. Theory. J. Biochem. Biophys. Methods // 2003. – **57**. – P. 213–236.
3. *Klotz I. M.* // Arch. Biochem. – 1946. – **9**. – P. 109–116.
4. *Scatchard G.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1949. – **51**. – P. 660–672.
5. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohaniance L., Goldberg M. E.* // J. Immunol. Methods. – 1985. – **77**. – P. 305–319.
6. *Bobrovnik S. A., Komisarenko S. V., Ilyina L. V.* // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – P. 170–174.
7. *Stevens F.* // Molec. Immunol. – 1987. – **24**. – P. 1055–1060.
8. *Klotz I. M., Huston D. L.* // Biochemistry. – 1971. – **10**. – P. 3065–3069.
9. *Бобровник С. А.* // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 3. – С. 155–161.
10. *Stevens F. J., Bobrovnik S. A.* // J. Immunol. Methods. – 2007. – **328**. – P. 53–58.

Получено 08.12.2008