



УДК 577.32.23

КОМПЛЕМЕНТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА  
G В РАСТВОРАХ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ*Тэтин С. Ю., Ефетов Ю. А., Троицкий Г. В.,  
Козлов Л. В. \*, Зинченко А. А. \***Крымский медицинский институт, Симферополь;**\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина Академии наук СССР, Москва*

При исследовании комплементфиксирующей активности IgG обнаружено, что в растворах 10–30% этиленгликоля сродство IgG к фактору C1q увеличивается. По данным аналитического ультрацентрифугирования и измерений мутности, такие концентрации этиленгликоля не приводят к росту числа агрегированных молекул IgG. Наблюдаемый эффект может объясняться конформационным переходом в молекулах IgG.

Ранее [1, 2] методом температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии нами было показано, что в молекулах IgG, находящихся в растворах, содержащих 2 М мочевины, 30% этиленгликоль или 30% глицерин, происходят полностью обратимые конформационные изменения, заключающиеся в уменьшении числа пертурбируемых температурой остатков тирозина, преимущественно в Fab-фрагментах белка. Эти изменения (по данным кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения) не затрагивают основной тип конформации IgG —  $\beta$ -структуру и заключаются в изменении междоменных взаимодействий в молекуле IgG.

Аналогичные по спектральным характеристикам, но меньшие по амплитуде конформационные переходы в IgG происходят при связывании гаптена [3].

В связи с этим в настоящей работе мы исследовали одну из антигензависимых функций IgG — связывание комплемента в присутствии указанных выше факторов.

В связи с одинаковым, по данным температурно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии, влиянием на конформацию IgG 2 М мочевины, 30% этиленгликоля и 30% глицерина, а также предполагаемым сходным механизмом таких конформационных изменений [1, 2] реакция связывания комплемента (РСК) была исследована на сыворотке морской свинки в присутствии каждого из этих соединений. Однако оказалось, что в растворах с 2 М мочевиной происходит полное подавление гемолиза, не зависящее от разведения сыворотки, что может свидетельствовать об инактивации комплемента мочевиной. Поэтому вся дальнейшая работа была проведена с этиленгликолем. Результаты, полученные для растворов IgG, содержащих глицерин, были аналогичными, но работа с глицерином представляет определенные технические трудности в силу большой вязкости растворов.

Было отмечено, что 30% этиленгликоль вызывает задержку гемолиза на 2–3 разведения по сравнению с контролем, где комплемент (сыворотка морской свинки) разводился PBS<sup>2+</sup>. Такая задержка гемолиза может быть обусловлена снижением активности комплемента под действием этиленгликоля или же тем, что в иммуноглобулинах, содержащихся в сыворотке морской свинки, происходит конформационный переход и они

\* Сокращения: РСК — реакция связывания комплемента; PBS<sup>2+</sup>, VBS<sup>2+</sup> — изотонические фосфатный и вероналовый буферы, pH 7,4, с Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, а VBSA<sup>2+</sup> — VBS<sup>2+</sup> с альбумином; EA — сенсibilизированные эритроциты барана; IgG — иммуноглобулин G.

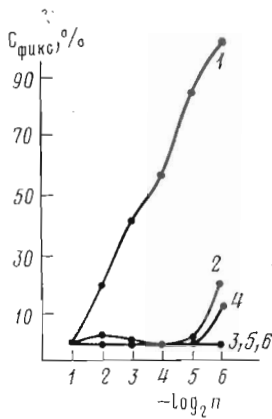


Рис. 1

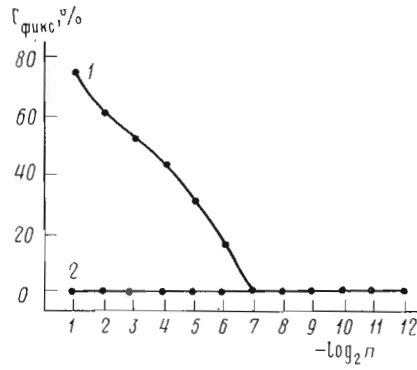


Рис. 2

Рис. 1. Влияние разведения комплемента ( $n$ ) на его связывание ( $C_{\text{фикс}}$ ) IgG человека (1, 2), Fab- (3, 4) и  $F(ab')_2$ -фрагментами (5, 6) в PBS<sup>2+</sup>-буфере в отсутствие (2, 3, 5) и в присутствии 30% этиленгликоля (1, 4, 6). Концентрации в опыте: IgG — 1,8 мг/мл, Fab-фрагментов — 1 мг/мл,  $F(ab')_2$ -фрагментов — 1 мг/мл

Рис. 2. Зависимость связывания комплемента от разведения IgG ( $n$ ). 1 — IgG в PBS<sup>2+</sup> и 30% этиленгликоле, 2 — IgG в PBS<sup>2+</sup>. Исходная концентрация IgG 2,2 мг/мл. Разведение сыворотки морской свинки 1 : 32

приобретают способность фиксировать комплемент. Для исключения влияния данного эффекта на результаты опыта с IgG человека расчеты производились по отношению к двум основным контролям. Результаты для системы, в которой не было этиленгликоля, соотносили с результатами, полученными для разведений комплемента в PBS<sup>2+</sup>; если же этиленгликоль присутствовал в исследуемой системе, то результат рассматривали по отношению к разведению комплемента в 30% этиленгликоле.

Реакция связывания комплемента проводилась по стандартной методике [4], но в отсутствие антигена. Результат выражался в доле фиксированного комплемента (%) по формуле [5]

$$C_{\text{фикс}} = \frac{A_k - A}{A_k} \cdot 100\%,$$

где  $A_k$  и  $A$  — поглощение комплемента в контрольном и опытном образцах соответственно при 412 нм. Параллельно с основным опытом ставились контроли отдельно с IgG, Fab-фрагментами,  $F(ab')_2$ -фрагментами, сывороткой крови, этиленгликолем, буферным раствором.

На рис. 1 представлены результаты РСК для IgG, выделенного из сыворотки крови одного из доноров. Для остальных четырех препаратов донорских IgG результаты были аналогичными. Как следует из полученных данных, IgG, находящийся в PBS<sup>2+</sup> с 30% этиленгликолем, приобретал способность фиксировать комплемент (доля фиксированного комплемента была велика даже при его высоких концентрациях — малых степенях разбавления), в то время как его папаиновые Fab- и пепсиновые  $F(ab')_2$ -фрагменты в этих же условиях комплемент не связывали.

На рис. 2 приведены результаты РСК для разных концентраций IgG, находящегося в PBS<sup>2+</sup> и 30% этиленгликоле. Минимальная концентрация, при которой в данной системе еще можно было зарегистрировать связывание комплемента, составляла 35 мкг/мл (6-е разведение).

В последующих опытах применен способ, позволяющий следить за изменениями активности компонента C1q по конкурентному ингибированию его эффектором [6]. В наших исследованиях эффектором служил IgG, находящийся в PBS<sup>2+</sup> с этиленгликолем или без него. Принцип такого способа заключается в следующем. Компонент C1q (источником которого, по данным [6], может быть малое количество сыворотки крови) ингибируется с сенсибилизированными эритроцитами барана (ЕА) в при-

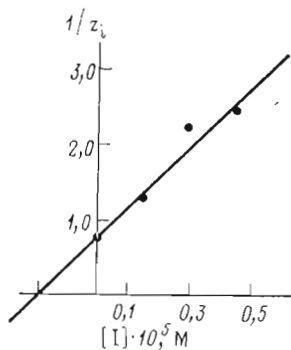


Рис. 3

Рис. 3. Определение величины  $K_i$  для связывания IgG с C1q в VBS<sup>2+</sup>.  $z_1$  — число гемолитически активных молекул C1q в присутствии IgG, [I] — концентрация IgG

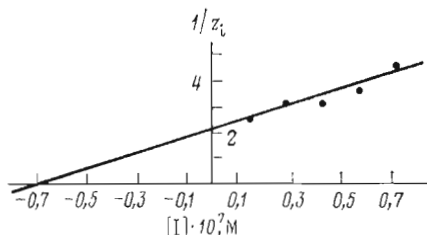


Рис. 4

Рис. 4. Определение величины  $K_i$  для связывания IgG с C1q в VBS<sup>2+</sup> и 10% этиленгликоле. Обозначения как на рис. 3

сутствии исследуемого IgG, который конкурирует с EA за связывание с C1q. Из реакционной смеси выделяется комплекс EAC1q и к нему добавляется реагент R1q (сыворотка крови человека, содержащая все компоненты комплемента, за исключением C1q), после чего измеряется гемолиз EA и проводится расчет доли гемолитически активных молекул —  $z$ . Величина  $z$  определяется по формуле [6]

$$z = \ln (A_{\text{л}} - A_{\text{р}}) / (A_{\text{л}} - A),$$

где  $A_{\text{л}}$ ,  $A_{\text{р}}$ ,  $A$  — величины оптического поглощения при 412 нм соответственно в контроле на полный лизис эритроцитов, в контроле на реагент и в опыте. В случае конкурентного связывания IgG с C1q активность последнего, выражаемая величинами  $z_0$  и  $z_1$ , зависит от концентрации IgG согласно уравнению

$$\frac{1}{z_1} = \frac{[I]}{z_0} \frac{1}{K_i} + \frac{1}{z_0},$$

где  $z_1$  — активность C1q в опыте;  $z_0$  — активность C1q в отсутствие IgG;  $K_i$  — константа диссоциации комплекса IgG · C1q; [I] — концентрация IgG. Построив график зависимости  $1/z_1$  от [I], получаем в точке пересечения прямой с осью абсцисс значение, равное  $-K_i$ .

Как уже выше указывалось, этиленгликоль в концентрации 30% несколько снижает активность комплемента. Поэтому при постановке опыта по описываемому способу с IgG, растворенным в VBS<sup>2+</sup> и 30% этиленгликоле, гемолиз отсутствовал как в опытной, так и в контрольных пробах. Подбор концентрации этиленгликоля, при которой в контроле происходит лизис эритроцитов, достаточный для учета и сравнения, показал, что при конечной концентрации этиленгликоля 10% величина  $A_{412}$  в системе без IgG составляла 0,4—0,5.

На рис. 3 и 4 приведено определение  $K_i$  для IgG в VBS<sup>2+</sup> и для этого же IgG, растворенного в VBS<sup>2+</sup> с 10% этиленгликолем. В первом случае  $K_i$  составляет  $(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$  М, а во втором —  $(7,2 \pm 1,2) \cdot 10^{-8}$  М. Соответственно  $K_{\text{асс}}$  равны  $4,8 \cdot 10^7$  и  $1,4 \cdot 10^9$  М<sup>-1</sup>, т. е. в растворе, содержащем 10% этиленгликоль, сродство IgG к компоненту C1q было значительно выше.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что IgG в отсутствие антигена приобретает способность связывать комплемент в растворах, содержащих этиленгликоль.

В настоящее время широко распространено мнение о необходимости агрегации антигенов для фиксации ими комплемента [7]. Поэтому возмож-

ность агрегации IgG в растворах, содержащих этиленгликоль, была нами исследована методом ультрацентрифугирования и при измерении разностной мутности.

При исследовании разностной мутности (постановку эксперимента см. в разделе «Экспериментальная часть») одного и того же образца IgG, находящегося в PBS<sup>2+</sup> и в этом же буфере с 30% этиленгликолем, оказалось, что мутность в обоих случаях одинакова как при 20° С, так и после инкубации IgG и PBS<sup>2+</sup> с этиленгликолем при 37° С в течение 1 ч. По данным аналитического ультрацентрифугирования, коэффициент седиментации IgG при концентрации белка 3,7 мг/мл в PBS<sup>2+</sup> и температуре 20° С составил 6,2 S, а в этом же буфере с 30% этиленгликолем — 2,2 S. При 37° С (условия РСК) и такой же концентрации этиленгликоля коэффициенты седиментации соответственно были 8,8 и 3,4 S. При учете вязкости растворов для данных температур коэффициенты седиментации соответствуют мономерному состоянию IgG. Кроме того, на всех седиментограммах пик белка был единственным и симметричным.

Результаты центрифугирования хорошо совпадают с данными, опубликованными ранее [8]. Тэнфорд с соавт. этим же методом показали, что агрегация  $\gamma$ -глобулина в растворах, содержащих этиленгликоль, отсутствует в интервале концентраций этиленгликоля до 60%.

Следовательно, можно заключить, что наблюдаемый эффект фиксации C1q-компонента IgG в растворах, содержащих этиленгликоль, не может быть объяснен агрегацией IgG при воздействии этиленгликоля, тем более что для регистрируемого нами увеличения константы связывания IgG и C1q с  $4,8 \cdot 10^7$  до  $1,4 \cdot 10^9$  M<sup>-1</sup> по крайней мере 30% IgG должно перейти в димерную форму, а это было бы заметно при ультрацентрифугировании и по появлению разностного спектра мутности.

Таким образом, наиболее вероятным объяснением увеличения комплексфиксирующей активности IgG в растворах этиленгликоля может служить предположение о конформационном переходе в IgG при воздействии этиленгликоля, подобном переходам в антителах при взаимодействии с антигеном. Так же можно объяснить и аналогичные результаты, полученные для IgG, находящегося в 30% глицерине. Указанный механизм не исключает влияния этиленгликоля и глицерина на конформацию и активность компонента C1q.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 5,5-диэтилбарбитуровую кислоту (веронал) и ее натриевую соль (мединал), глицерин (Serva, ФРГ), папаин (Merck, ФРГ), пепсин, DEAE-целлюлозу, ссфадекс G-100 (Sigma, США), сывороточный альбумин человека и этиленгликоль (Reanal, Венгрия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации не ниже ч. д. а.

*Изотонический фосфатный буфер с Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (PBS<sup>2+</sup>)* представляет собой 5 мМ фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,15 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 7,4: 81 мл 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19 мл 0,2 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35,1 г NaCl, 2 мл 1 М MgCl<sub>2</sub>, 0,6 мл 1 М CaCl<sub>2</sub>, объем доводится водой до 4 л.

*Изотонический вероналовый буфер с Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (VBS<sup>2+</sup>)*. 2 л. раствора содержат 5,75 г веронала, 3 г мединала, 85 г NaCl, 5 мл 1 М MgCl<sub>2</sub> и 1,5 мл 1 М CaCl<sub>2</sub>, рН 7,4. Перед работой буфер разводится в 5 раз.

*Изотонический буферный раствор с альбумином (VBSA<sup>2+</sup>)*, рН 7,4. В готовый VBS<sup>2+</sup> перед работой добавляется сывороточный альбумин человека в расчете 1 г белка на 1 л буферного раствора. Использование альбумина делает эритроциты менее подверженными спонтанному лизису.

*Сыворотка морской свинки*. Кровь брали из сердца морских свинок, центрифугировали 15 мин при 1500g. Супернатант разливали по пробиркам и хранили при -15° С.

*Сыворотка крови человека*. Кровь брали из вены, центрифугировали 15 мин при 1500g. Супернатант разливали по пробиркам и хранили при -15° С.

Пять препаратов IgG были получены из сывороток крови пяти здоровых людей ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе [9]. Уравновешивание целлюлозы и элюирование проводили 5 мМ фосфатным буфером, рН 8,0. Чистоту препаратов контролировали диск-электрофорезом и иммунофорезом. Fab-фрагменты получали папаиновым гидролизом, F(ab')<sub>2</sub> — пепсиновым гидролизом с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-100 и ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе [10].

Получение эритроцитов барана и сенсibilизированных эритроцитов (ЕА) описано в работе [11].

Получение реагента R1q описано в работе [6].

Реакция связывания комплемента (РСК). 0,3 мл реакционной смеси (0,1 мл IgG в концентрации 3—4 мг/мл + 0,1 мл сыворотки морской свинки в нужном разведении + 0,1 мл 90% этиленгликоля или PBS<sup>2+</sup>) инкубировали 1 ч при 37° С. Добавляли 100 мкл суспензии ЕА (1,5·10<sup>8</sup> клеток в 1 мл), выдерживали 1 ч при 37° С, после чего объем доводили до 2,9 мл с помощью PBS<sup>2+</sup> или 30% этиленгликоля в PBS<sup>2+</sup>. Полученный раствор центрифугировали 5 мин при 1500g. Надосажок фотометрировали при 412 нм.

Ингибирование С1q. 100 мкл раствора IgG нужной концентрации и 200 мкл суспензии ЕА (1,5·10<sup>8</sup> клеток в 1 мл) в VBS<sup>2+</sup> инкубировали 15 мин при 4° С. (Если реакцию проводили в 10% этиленгликоле, то к 100 мкл раствора IgG добавляли 100 мкл суспензии ЕА — 3·10<sup>8</sup> клеток в 1 мл в VBS<sup>2+</sup>, 70 мкл VBS<sup>2+</sup> и 30 мкл этиленгликоля.) Добавляли 0,1 мл сыворотки крови человека, инкубировали 15 мин при 30° С. Реакцию останавливали, охлаждая пробы до 4° С, центрифугировали 5 мин при 1500g и 4° С. Супернатант сливали, к осадку ЕАС1q добавляли 0,5 мл раствора реагента R1q (90 мкл реагента + 410 мкл VBSA<sup>2+</sup> или 90 мкл реагента + 50 мкл этиленгликоля + 360 мкл VBSA<sup>2+</sup>) и тщательно перемешивали встряхиванием. Суспензию инкубировали 30 мин при 37° С. Добавляли 2,5 мл 0,15 М NaCl или 10% этиленгликоля в VBSA<sup>2+</sup>, центрифугировали 10 мин при 1500g и измеряли поглощение при 412 нм (A<sub>412</sub>). Полученную величину, а также значения A<sub>412</sub> для полного лизиса эритроцитов и для контроля реагента (без С1q) использовали для расчета величины z.

Температурно-пертурбационные дифференциальные спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS (Carl Zeiss, ГДР) в кюветках длиной 1 см при длинах волн 250—330 нм и в интервале 9—45° С. Концентрация белков в опытах составляла 0,7—0,95 мг/мл. Расчет числа пертурбируемых остатков тирозина и триптофана проводился так, как было описано ранее [1, 2]. Дисперсию оптического вращения исследовали на спектрополяриметре 241 MC (Perkin — Elmer, США). Спектры кругового дихроизма регистрировали на дихрографе Mark III (Jobin Ivon, Франция). Ультрацентрифугирование проводили на аналитической центрифуге Beckman E (США).

Разностную мутность исследовали на спектрофотометре Specord UV VIS по следующей методике: в каждом луче двухлучевого спектрофотометра находились две 1-см кюветы. В одном из лучей — кюветы 1 и 2, в другом — 3 и 4. В начале опыта в кюветках 1 и 3 содержалось по 2 мл IgG в PBS<sup>2+</sup> (концентрация IgG — 1,75 мг/мл), в кюветках 2 и 4 — по 2 мл PBS<sup>2+</sup>. Разностный спектр мутности в интервале 333—667 нм на максимальной чувствительности прибора при правильной постановке опыта совпадает с нулевой линией прибора. Затем в кюветы 1 и 4 добавляли по 1 мл 90% этиленгликоля в PBS<sup>2+</sup>, а в кюветы 2 и 3 — по 1 мл PBS<sup>2+</sup>. После тщательного перемешивания регистрировали спектр в том же интервале длин волн сразу и после инкубации всех четырех кювет при 37° С 1 ч (условия методики РСК).

Авторы выражают благодарность А. Н. Туркину и Н. Г. Коровянскому (Институт белка АН СССР, Пущино) за проведенное ультрацентрифугирование препаратов IgG.

1. Троицкий Г. В., Тэттин С. Ю., Ефетов К. А. Биофизика, 1984, т. 29, № 4, с. 578–582.
2. Троицкий Г. В., Тэттин С. Ю., Ефетов К. А. Докл. АН УССР, сер. Б, 1984, № 2, с. 83–86.
3. Loseva O. I., Abramov V. M., Zav'yalov V. P., Troitsky G. V., Oisovska Z., Franek F. Eur. J. Biochem., 1982, v. 121, № 3, p. 631–635.
4. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунология. М.: Медицина, 1968, с. 140–161.
5. Lewine L., Van Vunakis H. Methods in Enzymol., 1967, v. 11, p. 928–936.
6. Козлов А. В., Зинченко А. А., Соляков Л. С., Сизой М. И., Ниценко А. М., Матиошин С. В., Андреев С. В. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1047–1055.
7. Davies D. R., Metzger H. Annu. Rev. Immunol., 1983, v. 1, p. 87–117.
8. Tanford Ch., Buckley C. E., De P. K., Lively E. P. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 6, p. 1168–1171.
9. Незлин Р. С. Строение и биосинтез антител. М.: Наука, 1972, с. 312.
10. Брок П. В сб.: Иммунологические методы / Под ред. Фримеля Х. М.: Мир, 1979, с. 298–317.
11. Козлов А. В., Крылова Ю. П., Чух В. П., Молчанова Н. В. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 652–659.

Поступила в редакцию  
4.11.1985

### IgG COMPLEMENT-BINDING ACTIVITY IN GLYCOL SOLUTIONS

TETIN S. Yu., EFETOV K. A., TROITSKY G. V., KOZLOV L. V. \*,  
ZINCHENKO A. A. \*

*Crimean Medical Institute, Simferopol; \*M. M. Shemyakin Institute  
of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Affinity of IgG to the first complement factor C1q was found out to increase in 10–30% glycol solutions. Analytical ultracentrifugation and turbidity data showed that IgG molecules do not aggregate at such concentrations of glycol. The complement-binding effect may be caused by a conformational transition in the IgG molecules.