

ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ В СИСТЕМАХ «ФЕРМЕНТ – СУБСТРАТ» И «АНТИГЕН – АНТИТЕЛО»

С использованием метода дисперсионного анализа количественно оценена значимость воздействия алкилоксибензолов (АОБ) на компоненты реакций «фермент – субстрат» и «антиген – антитело». Установлено, что в подобных двухкомпонентных системах C_1 -АОБ проявлял свое действие как через модификацию функциональной активности белковых молекул, так и посредством изменения свойств субстратов и, особенно, антигенов. С другой стороны, наиболее значимым механизмом действия C_6 -АОБ оказывалось его прямое модифицирующее действие на активность ферментов и антигенсвязывающую способность антител.

Ключевые слова: алкилоксибензолы, модификация функциональной активности белков, изменение свойств субстратов и антигенов.

Алкилоксибензолы (АОБ) составляют широкую группу молекул микробного и растительного происхождения [1]. Универсальные механизмы их биологической активности заключаются в установлении гидрофобных, электростатических и водородных взаимодействий с широким кругом биополимеров, результатом чего является модификация структурной организации и функциональной активности последних [2, 3]. При этом формирование подобных эффектов оказывается возможным и в гетерологичных системах, в частности – в отношении ферментных и рецепторных белков животного происхождения [4, 5]. Другой интересной особенностью АОБ является их способность модифицировать свойства полимерных субстратов [6].

Сказанное определяет интерес к исследованию эффектов алкилоксибензолов в двухкомпонентных биологических системах с выявлением относительной силы воздействия на каждый из компонентов реакции. В частности, целью настоящей работы явился дисперсионный анализ эффектов АОБ в ферментной системе «лизоцим – *Micrococcus luteus*», а также их влияния на специфическое взаимодействие антител к *Toxoplasma gondii* с соответствующими антигенами.

При проведении исследований в качестве химических аналогов микробных АОБ использовали метилрезорцин (C_1 -АОБ, мол. вес = 124) и гексилрезорцин (C_6 -АОБ, мол. вес = 194) со степенью очистки 99,9% (Sigma, США). Исходные концентрации данных веществ, взаимодействующих с компонентами анализируемых реакций, составляли $0,2 \times 10^{-7}$, 2×10^{-5} и 2×10^{-3} М в ферментной системе и $0,2 \times 10^{-7}$, 2×10^{-6} , 2×10^{-5} , 2×10^{-4} и 2×10^{-3} М в системе с участием антител и антигенов. Для формирования охарактеризо-

ванных выше физико-химических взаимодействий ферменты, антитела, бактериальные клетки и антигены предварительно инкубировали в контакте с АОБ при 37°C в течение 60 мин., после чего запускали сами реакции путем смешивания действующих компонентов.

Ферментную литическую систему формировали путем смешивания коммерческого препарата лизоцима яичного белка (ЕС 3.2.1.17) с культурой *Micrococcus luteus* АТСС 15307. Для этого клетки *M. luteus* культивировали на жидкой питательной среде в течение 24 часов при температуре 37°C , после чего биомассу отделяли центрифугированием и ресуспендировали в фосфатном буфере рН 6,2 до оптической плотности 0,5 ед. (ширина кюветы 1 см, длина волны 540 нм), что соответствовало абсолютному содержанию бактериальных клеток на уровне $2,85 \times 10^7$ КОЕ/мл. После совместной часовой инкубации с различными концентрациями алкилоксибензолов к полученной суспензии объемом 2,8 мл, добавляли 0,2 мл раствора лизоцима с концентрацией 2×10^{-5} М, также предварительно обработанного АОБ, и определяли значения оптической плотности образца в течение 10 мин с интервалом 10 сек. Эффективность литической реакции характеризовали величиной ее максимальной скорости (V_{max}), для чего строили касательную к кривой падения оптической плотности с последующим расчетом по формуле:

$$V_{max} = \frac{C_{нач} - C_{кон}}{t_{кон} - t_{нач}},$$

где $C_{нач}$ и $C_{кон}$ – содержание клеток *M. luteus* в 1 мл суспензии при $t_{нач}$ и $t_{кон}$ – времени начала и окончания участка максимальной скорости лизиса. При этом на основании заранее определенной пропорциональности между значениями опти-

ческой плотности и содержанием бактериальных клеток в пробе скорость лизиса выражали величиной абсолютного количества клеток, разрушающихся при воздействии лизоцима в 1 мл реакционной смеси в единицу времени: КОЕ/млхсек.

Эксперименты по исследованию эффектов АОБ в системе «антиген – антитело» проводились с использованием наборов «ВектоТоксо-IgG» (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) для иммуноферментного количественного определения иммуноглобулинов класса G к *Toxoplasma gondii*. В качестве источника антител использовали имеющийся в них контрольный образец с концентрацией иммуноглобулинов 50 МЕ/мл, антигенами служили соответствующие компоненты, сорбированные на дне полистироловых планшетов. Перед проведением эксперимента АОБ в обозначенных выше концентрациях смешивали с антителами в соотношении 1:1, а также после аналогичного разведения дистиллированной водой вносили в лунки полистироловых планшетов и инкубировали при 37 °С в течение 60 мин. для созревания соответствующих комплексов. В дальнейшем планшет промывали и вносили в него образцы антител, модифицированных АОБ, после чего оценивали взаимодействие в системе «антиген – антитело» с использованием технологии иммуноферментного анализа. Показатели связывания характеризовали относительной величиной оптической плотности (ОП), регистрируя последнюю при 450 нм.

Таблица 1. Скорости ферментативной реакции (V_{max} , КОЕ/млхс), формирующиеся в литической системе «лизоцим – *Micrococcus luteus*» после воздействия АОБ

Концентрация АОБ при модификации лизоцима (строки) или клеток (столбцы), М	0	2×10^{-7}	2×10^{-5}	2×10^{-3}
C ₁ -АОБ				
0	5903	6342	6614	6974
2×10^{-7}	6141	6250	6387	7019
2×10^{-5}	6547	6413	6598	7129
2×10^{-3}	7001	6778	6949	7205
C ₆ -АОБ				
0	5628	4408	3658	2345
2×10^{-7}	4660	3846	2720	2144
2×10^{-5}	3752	3749	2064	750
2×10^{-3}	3564	2940	1688	469

Все эксперименты выполнены минимум в трех повторностях. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием пакета программ «Microsoft Excel», в том числе модуля «Анализ данных» в варианте двухфакторного дисперсионного анализа без повторений.

В ходе проведенных исследований было установлено, что действие различных АОБ в использованных двухкомпонентных системах неоднозначно.

Так в ферментной системе «лизоцим – *M. luteus*» метилрезорцин во всем диапазоне использованных концентраций и вариантах постановки экспериментов вызывал увеличение скорости литической реакции. При этом обработка лизоцима увеличивающимися от 0 до 2×10^{-7} , 2×10^{-5} и 2×10^{-3} М концентрациями C₁-АОБ результировалась в росте значений V_{max} в ряду 5903 > 6343 > 6614 > 6974 КОЕ/млхсек. В свою очередь прединкубация клеток *M. luteus* в том же диапазоне концентраций C₁-АОБ прогрессивно увеличивала скорость лизиса от 5903 до 7001 КОЕ/млхсек. Одновременная же обработка названных компонентов ферментной системы еще более увеличивала V_{max} , наибольшие значения которой были достигнуты в случае предварительной инкубации как лизоцима, так и клеток *M. luteus* с C₁-АОБ в наибольшей из использованных концентраций (таблица 1).

В свою очередь гексилрезорцин вызывал в ферментной литической системе противоположные дозозависимые ингибирующие эффекты, заключающиеся в снижении регистрируемых значений V_{max} с 5628 до 2354 КОЕ/млхсек в варианте эксперимента с предварительной обработкой лизоцима и до 3564 КОЕ/млхсек при инкубации C₆-АОБ в контакте с клетками *M. luteus*. Наиболее же выраженные эффекты C₆-АОБ и в этом случае были установлены при его одновременном воздействии на оба компонента системы: минимальные значения $V_{max} = 469$ КОЕ/млхсек достигнуты в случае предварительной инкубации как лизоцима, так и клеток *M. luteus* с данным алкилоксибензолом в концентрации 2×10^{-3} М (таблица 1).

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о возможности воздействия АОБ как на ферментную, так и на субстратную составляющую литической системы «лизоцим – *M. luteus*», что определило задачу выявления

влияния каждого из обозначенных факторов на результат эксперимента. Для ее решения нами был использован метод дисперсионного анализа, предложенный Р. Фишером для исследования влияния одной или нескольких качественных переменных на одну зависимую количественную переменную. При этом в качестве причин (факторов, или независимых переменных) нами рассматривались комплексы «лизоцим – АОБ» и «*M.luteus* – АОБ», формирующиеся при различных использованных концентрациях алкилоксибензолов, а в качестве следствия (зависимой переменной) достигаемые при их смешивании значения V_{max} .

Проведенный в исследуемом двухфакторном равномерном комплексе расчет дисперсионного отношения позволил опровергнуть нулевую гипотезу на высоком уровне значимости ($P < 0,01$ для C_1 -АОБ и $P < 0,001$ для C_6 -АОБ), что свидетельствовало о достоверном влиянии на зависимую переменную каждого из регулирующих факторов. Последующий же анализ, направленный на определение силы воздействия регулирующих факторов, позволил оценить значимость взаимодействия АОБ с каждым из компонентов литической системы.

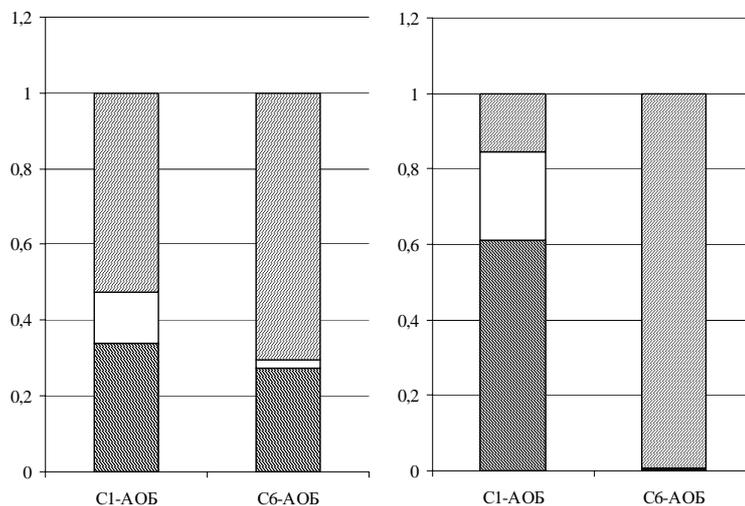
Так характеризуемое коэффициентом детерминации (h^2) преимущественное влияние C_1 -АОБ на литическую систему реализовывалось через модифицирующее воздействие на активность лизоцима: $h^2_{лиз} = 0,53$. Одновременно 34% эффекта C_1 -АОБ в подобной ферментной системе определялось изменением (повышением) степени лизоцимчувствительности клеток *M.luteus* с сохранением 13% за неучтенными в модели факторами. С другой стороны, для C_6 -АОБ варьирование, вызванное влиянием неучитываемых факторов, не превышало 3%, в то время как рассчитанные значения коэффициентов детерминации составили $h^2_{лиз} = 0,70$ и $h^2_{Мл} = 0,27$ (рисунок).

В серии аналогичных экспериментов с использованием системы «антитело – антиген» характер действия алкилоксибензолов несколько отличался от описанного выше. Так обработка каждого из

компонентов реакции, как C_1 -АОБ, так и C_6 -АОБ, в диапазоне концентраций от 0 до $2 \times 10^{-3}M$ результировалась в снижении выраженных в единицах оптической плотности величин взаимодействия, при этом количественные характеристики подобных эффектов вновь зависели от природы АОБ.

При модификации антител в использованном диапазоне концентраций C_1 -АОБ зарегистрировано снижение показателей их связывания с соответствующими антигенами лишь на 7% от контрольных значений. В свою очередь предварительная инкубация антигенов с данным ауторегулятором несколько больше изменяла значения отражающей количество образовавшихся комплексов «антиген – антитело» оптической плотности, изменяющейся с увеличением действующих концентраций C_1 -АОБ в ряду $0,745 > 0,776 > 0,754 > 0,710 > 0,666 > 0,672$. В результате же параллельной обработки каждого их названных компонентов реакции вышеописанные эффекты частично суммировались, при этом наименьшие показатели связывания достигались в случае предварительной инкубации антител с C_1 -АОБ в концентрациях 2×10^{-4} и $2 \times 10^{-3}M$, а антигенов в концентрации $2 \times 10^{-3}M$ (таблица 2).

На этом фоне C_6 -АОБ оказывал на способность антител к специфическому взаимодей-



По оси абсцисс – используемые АОБ; по оси ординат – коэффициент детерминации (h^2), описывающий силу их влияния на отдельные компоненты систем.

Обозначения: 1 – лизоцим, 2 – клетки *M. luteus*, 3 – антитела к *T. gondii*, 4 – антигены *T. gondii*, 5 – прочие (неучтенные) факторы.

Рисунок. Оценка модифицирующего влияния АОБ на компоненты систем «фермент – субстрат» (а) и «антиген антитело» (б).

Таблица 2. Показатели связывания (ОП, ед.), формирующиеся в системе «антитело – антиген» после воздействия АОБ

Концентрация АОБ при модификации антител (строки) или антигенов (столбцы)	0	2×10^{-7}	2×10^{-6}	2×10^{-5}	2×10^{-4}	2×10^{-3}
C ₁ -АОБ						
0	0,745	0,720	0,758	0,716	0,744	0,692
2×10^{-7}	0,776	0,757	0,784	0,725	0,741	0,712
2×10^{-6}	0,754	0,704	0,733	0,717	0,721	0,722
2×10^{-5}	0,710	0,668	0,701	0,690	0,679	0,680
2×10^{-4}	0,666	0,689	0,709	0,682	0,701	0,677
2×10^{-3}	0,672	0,730	0,698	0,686	0,657	0,660
C ₆ -АОБ						
0	0,515	0,537	0,504	0,493	0,497	0,099
2×10^{-7}	0,512	0,537	0,514	0,506	0,485	0,102
2×10^{-6}	0,507	0,528	0,496	0,497	0,457	0,099
2×10^{-5}	0,482	0,499	0,485	0,468	0,457	0,098
2×10^{-4}	0,496	0,504	0,493	0,473	0,460	0,094
2×10^{-3}	0,480	0,531	0,493	0,495	0,455	0,098

ствию с соответствующими антигенами значительно более выраженные эффекты. При этом результатом являлось существенное снижение параметров связывания с увеличением концентрации данного алкилоксибензола, изменяющихся в ряду $0,515 > 0,537 > 0,504 > 0,493 > 0,497 > 0,099$ и в максимуме эффекта отклоняющихся от контрольных значений на 81%. С другой стороны, при инкубации антигенов с C₆-АОБ показатели связывания менялись незначительно, что сопровождалось их достаточно слабым влиянием на параметры системы при одновременной обработке антител и антигенов (таблица 2).

Окончательное ранжирование значимости эффектов АОБ в системе «антиген – антитело» вновь было осуществлено с использованием метода дисперсионного анализа. При этом, подобно описанному выше примеру в качестве независимых переменных нами рассматривались комплексы «антитело – АОБ» и «антиген – АОБ», формирующиеся при различных концентрациях алкилоксибензолов, а в качестве зависимых – достигаемые при различных вариантах их сочетания значения оптической плотности системы.

Проведенный при этом расчет дисперсионного отношения позволил констатировать статистическую достоверность влияния каждой из независимых переменных на уровне $P < 0,05$ для

C₁-АОБ и $P < 0,001$ для C₆-АОБ. При этом для C₁-АОБ преимущественное влияние на изученную двухкомпонентную систему реализовывалось через модифицирующее воздействие на антигены: $h^2_{Аг} = 0,61$, в то время как лишь 16% эффекта определялось влиянием на антигенсвязывающую способность антител. Одновременно неучтенными оставалось 23% дисперсии, что существенно превышало аналогичное значение $< 1\%$, вычисленное для системы, модифицированной C₆-АОБ. В свою очередь еще одно значимое отличие в эффектах гексилрезорцина по сравнению с метилрезорцином заключалось в том, что влияние первого из названных АОБ было максимальным в отношении антигенсвязывающей способности антител (коэффициент детерминации $h^2_{Аг} = 0,99$), в то время как в отношении антигенов оно характеризовалось минимальной величиной $h^2_{Аг} = 0,0047$ (рисунок).

Таким образом, использование метода дисперсионного анализа позволило количественно оценить значимость воздействия алкилоксибензолов на компоненты реакций «фермент – субстрат» и «антиген – антитело». При этом особенностями действия C₁-АОБ и C₆-АОБ в ферментной системе являлась противоположная направленность инициируемых ими эффектов (стимуляция и ингибция лизиса соответственно), в то время как во второй системе назван-

ные алкилоксибензолы действовали сонаправленно, обуславливая только снижение показателей специфического связывания антител с соответствующими антигенами.

На этом фоне эффекты C_1 -АОБ в обеих системах не могли быть сведены исключительно к его воздействию на регулирующие факторы (процент необъясненной дисперсии от 13 до 23%), в то время как эффекты C_6 -АОБ интерпретировались более однозначно. Одновременно C_1 -АОБ оказывался значим не только как фактор, вызывающий модификацию свойств белковых молекул, но в значительной степени проявляя свое действие через изменение свойств

субстратов и, особенно, антигенов. С другой стороны, наиболее значимым механизмом действия C_6 -АОБ оказывалось его прямое модифицирующее действие на ферментативную активность лизоцима и антигенсвязывающую способность антител.

Полученные результаты существенно расширяют представления о значимости эффектов алкилоксибензолов в двухкомпонентных биологических системах, одновременно открывая возможности для управления протекающими в них ферментативными и неферментативными реакциями. Разработке подобных подходов будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Список использованной литературы:

1. Kozubek A., Tuman J.H.P. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity // Chem.Rev. 1999. V. 99. №1. P. 1-31.
2. Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Степаненко И.Ю., Шаненко Е.Ф., Мартиросова Е.И., Плакунов В.К., Козлова А.Н., Борзенков И.А., Коротина О.А., Родин Д.С., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменения физико-химических свойств белков, модифицированных алкилоксибензолами // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. №2. С. 159-167.
3. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Эль-Регистан Г.И. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных аутоиндукторов анабиоза // Микробиология. 2005. Т.74. №5. С.616-625.
4. Колпаков А.И., Ильинская О.Н., Беспалов М.М., Куприянова-Ашина Ф.Г., Гальченко В.Ф., Курганов Б.И., Эль-Регистан Г.И. Стабилизация ферментов аутоиндукторами анабиоза как один из механизмов устойчивости покоящихся форм микроорганизмов // Микробиология. 2000. Т.69. №2. С. 224-230.
5. Kozubek A., Wroblewski Z. Cereal grain long chain amphiphilic resorcinolic lipids inhibit significantly binding of fibrinogen by platelets whereas short chain resorcinolic lipids and fatty acids do not // Stud.Biophys. 1990. №139 P. 177-181.
6. Мартиросова Е.И., Карпекина Т.А., Эль-Регистан Г.И. Модификация ферментов естественными химическими шаперонами микроорганизмов // Микробиология. 2004. Т.73. №5. С. 708-715.

**Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований
(проект 08-04-99078-р_офи)**