

ВЛИЯНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ Fc-ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ

В системе комплементзависимого гемолиза изучена способность алкилоксибензолов (АОБ) изменять функциональную активность Fc-фрагментов антител, ответственных за инициацию классического пути активации комплемента. Установлено, что в подобной системе C₆-АОБ и C₁₂-АОБ, но не C₁-АОБ и C₃-АОБ в высоких концентрациях обладают собственным гемолитическим эффектом. В более низких концентрациях C₆-АОБ и C₁₂-АОБ оказывают влияние на кинетические характеристики реакции комплементзависимого гемолиза, вызывая увеличение времени наступления лизиса 50% клеток-мишеней без изменения скорости литической реакции.

Ключевые слова: антитела, алкилоксибензолы, Fc-фрагменты, комплемент, гемолиз.

Алкилоксибензолы (АОБ) составляют широкую группу биологически активных веществ микробного и растительного происхождения [1]. Возрастающий интерес к данной группе молекул объясняется их способностью к неспецифическому взаимодействию с широким кругом биополимеров, значимо изменяющему функциональные характеристики последних. Так контакт АОБ с ДНК сопровождается образованием надмолекулярных комплексов [2], модулирующих транскрипционную активность. Результатом взаимодействия АОБ с липидами цитоплазматических мембран является изменение характеристик ионного транспорта и водного баланса клетки [3]. Образуя комплексы с ферментными белками, АОБ изменяют степень их набухаемости, вязкость и гидрофобность, что сопровождается изменением каталитической активности [4].

Учитывая тот факт, что алкилоксибензолы в значимых количествах поступают в организм человека или животных с пищей, а также эндогенно образуются некоторыми представителями микробиоценоза, данная группа молекул может рассматриваться в качестве потенциальных участников ряда физиологических и патологических процессов. В частности, накапливающиеся данные позволяют говорить о некоторых АОБ как иммуномодуляторах, изменяющих розеткообразующую активность Т-лимфоцитов и интенсивность активации нейтрофилов при фагоцитозе [5], а также оказывающих цитотоксическое действие на мононуклеарные фагоциты [6]. Кроме того, в наших предшествующих исследованиях [7] показана возможность прямого взаимодействия АОБ с антигенсвязывающими (Fab) фрагмен-

тами антител, результатом чего является снижение их avidности, афинности и частичное изменение специфичности.

В то же время упоминавшийся неспецифический характер контакта АОБ с биополимерами, объясняемый установлением широкого спектра гидрофобных, электростатических и водородных взаимодействий, позволяет предполагать возможность их взаимодействия и с другими участками антител. В частности, целью настоящей работы является изучение влияния четырех гомологов АОБ на функциональную активность Fc-фрагментов антител, ответственных за инициацию «классического» пути активации системы комплемента.

При проведении исследований в качестве химических аналогов микробных ауторегуляторов использовали гомологи, различающиеся длиной алкильного радикала и определяемой этим степенью гидрофобности: C₁-АОБ (мол. вес = 124) и C₆-АОБ (мол. вес = 194) со степенью очистки 99,9% (Sigma, США), а также C₃-АОБ (мол. вес = 152) и C₁₂-АОБ (мол. вес = 278) (Epsamine, Украина). Структурные формулы данных веществ приведены на рисунке 1. Перед проведением экспериментов АОБ разводили в дистиллированной воде до получения концентраций $2,5 \times 10^{-7}$, $2,5 \times 10^{-6}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-4}$ и $2,5 \times 10^{-3}$ М. В связи с низкой гидрофильностью C₁₂-АОБ использовали его растворы в 5% этаноле.

Определение прямого гемолитического эффекта АОБ проводили с использованием суспензии интактных (несенсибилизированных) эритроцитов барана в растворе Олсвера с количеством клеток на 1 мл 5×10^8 . В этом случае суспензию эритроцитов смешивали в соотношении 4:1 с рабочими разведениями АОБ

и выдерживали в течение 60 мин при 37 °С с постоянным перемешиванием; в качестве контроля использовали эритроциты, инкубированные в контакте с соответствующим растворителем. О развитии гемолиза судили по изменению оптической плотности при длине волны 800 нм, измеренному с помощью спектрофлуориметра «Панорама» (НПФ «Люмекс», Россия).

При исследовании влияния АОБ на функциональную активность Fc-фрагментов антител использовали те же эритроциты, предварительно сенсibilизированные антиэритроцитарной (гемолитической) сывороткой (ФГУП «НПО «Микроген») в разведении 1:3000. После удаления несвязанных антител центрифугированием (1000 об/сек; 10 мин.) сенсibilизированные эритроциты ресуспендировали в веронал-мединаловом буфере до концентрации 5×10^8 СЭБ/мл, после чего смешивали в соотношении 4:1 с исходными разведениями АОБ и выдерживали в течение 60 мин. при 37 °С, несвязанные АОБ вновь удаляли центрифугированием. Выполнение подобной процедуры обеспечивало взаимодействие АОБ с Fc-фрагментами антител, к этому времени специфически фиксированных на поверхности эритроцитов, одновременно исключая возможность подобного контакта с их Fab-фрагментами.

Комплементзависимый лизис эритроцитов инициировали внесением 50 мкл предварительно разведенного в веронал-мединаловом буфере коммерческого препарата «Сыворотка диагностическая гемолитическая жидкая» (МХ «МЕДЭП»). Измерение оптической плотности эритроцитов вновь проводили на спектрофлуориметре «Панорама» (НПФ «Люмекс») в кинетическом режиме в течение 600 секунд с момента внесения комплемента с интервалом 10 сек. Для характеристики эффективности литической реакции использовали величину максимальной скорости лизиса (V_{max}), рассчитываемую по формуле

$$V_{max} = [(OD_1 - OD_2) / \Delta t] / 2,798 \quad [8],$$

где OD_1 и OD_2 – оптическая плотность суспензии в начальной и конечной точке интервала времени Δt , равного 10 сек. Значения V_{max} выражали величинами ЛЕК (литическая единица комплемента), соответствующими лизису 1 эритроцита в 1 мл за 1 сек. Другим определяе-

мым параметром являлось $t_{50\%}$ – время (сек.), необходимое для развития 50% лизиса эритроцитов (рисунок 2).

Все эксперименты выполнены минимум в пяти повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными математическими методами (t-тест Стьюдента) в программе Microsoft Excel 2003.

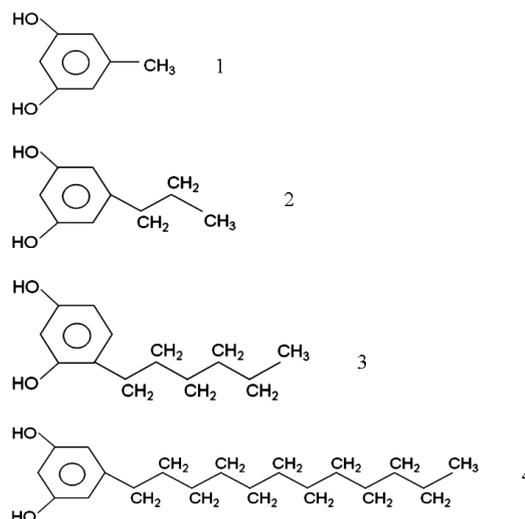


Рисунок 1. Структурные формулы химических аналогов микробных ауторегуляторов: 1 – C₁-АОБ, 2 – C₃-АОБ, 3 – C₆-АОБ, 4 – C₁₂-АОБ.

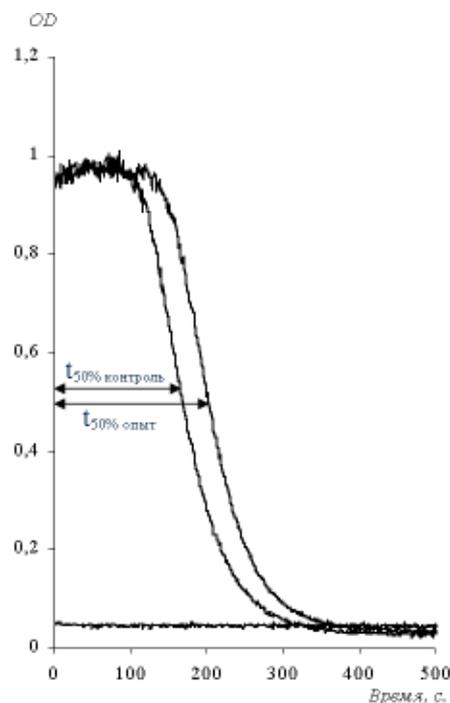


Рисунок 2. Пример кинетики реакции комплементзависимого лизиса эритроцитов: по оси абсцисс – время, с; по оси ординат – оптическая плотность (OD).

В ходе проведенных исследований было установлено, что некоторые АОБ обладают собственной гемолитической активностью, зависящей от особенностей их химического строения и используемых концентраций. Так если C_1 -АОБ и C_3 -АОБ во всем диапазоне исследуемых концентраций не вызывали лизиса эритроцитов, то контакт последних с более гидрофобными C_6 -АОБ и C_{12} -АОБ в концентрации $2,5 \times 10^{-3} M$ вел к полному гемолизу как несенсибилизированных, так и сенсибилизированных клеток-мишеней. В данном контексте полученные результаты, согласующиеся с представлениями о мембранотропности ряда АОБ [3, 9], определили некоторые ограничения и требования для проведения последующих исследований, заключающиеся в исключении их рассмотрения высоких концентраций некоторых алкилоксибензолов.

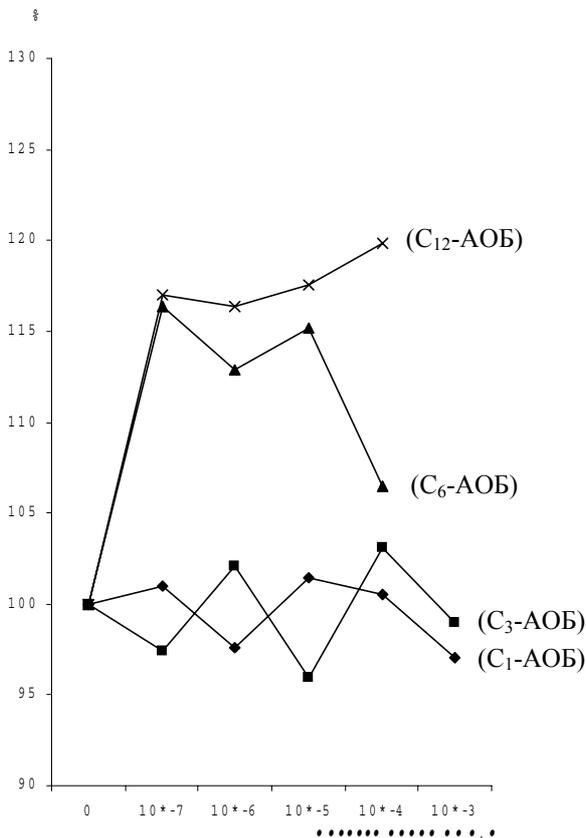


Рисунок 3. Изменение времени наступления 50% комплементзависимого лизиса эритроцитов (по оси ординат, % от контроля) в зависимости от химической природы и используемых концентраций алкилоксибензолов (по оси абсцисс, M), предварительно взаимодействующих с Fc-фрагментами сенсибилизирующих антител.

Проведение подобных исследований в гемолитической системе, включающей сенсибилизированные эритроциты (СЭ) и систему комплемента, позволило констатировать, что предварительный контакт СЭ с АОБ, предусматривающий возможность взаимодействия последних с Fc-фрагментами использованных для сенсибилизации антител, способен изменять некоторые характеристики литической реакции.

Параметром, в отношении которого не было установлено достоверных изменений при использовании ни одного АОБ во всем диапазоне использованных концентраций, оказалась V_{max} , устойчиво находящаяся в диапазоне от $(3,21 - 3,39) \times 10^3$ ЛЕК для C_1 -, C_3 -, C_6 -АОБ и до $3,55 \times 10^3$ ЛЕК для C_{12} -АОБ. С другой стороны, значения $t_{50\%}$ демонстрировали достоверную зависимость как от особенностей химического строения, так и от количественного присутствия АОБ. При этом основным регистрируемым эффектом являлось увеличение времени наступления 50% лизиса эритроцитов по сравнению с контролем (рисунок 3). В частности, предварительная инкубация СЭ в контакте с C_6 -АОБ и C_{12} -АОБ вела к достоверному увеличению $t_{50\%}$ на $12,86 \pm 0,62\%$ - $19,88 \pm 1,09\%$ соответственно по сравнению с контролем, для C_6 -АОБ наиболее выраженному в диапазоне концентраций $2,5 \times 10^{-7} - 2,5 \times 10^{-5}$, а при использовании наиболее гидрофобного C_{12} -АОБ закономерно возрастающему до концентрации $2,5 \times 10^{-4} M$. В свою очередь использование C_1 -АОБ и C_3 -АОБ достоверно не изменяло временных характеристик литической реакции.

Таким образом, полученные результаты могут рассматриваться в качестве одного из доказательств в пользу взаимодействия АОБ не только с Fab-, но и с Fc-фрагментами антител с соответствующим изменением не только их антигенсвязывающей способности, но и функциональной активности. В частности, подобное изменение может реализовываться через «затруднение» инициации классического пути активации комплемента, в норме возникающего в результате взаимодействия Fc-фрагментов с C1(qrs)-компонентом комплемента. Результатом этого является увеличение времени, необходимого для лизиса 50% присутствующих в пробе клеток-мишеней, но не скорости самой литической реакции, определяемой собственны-

ми кинетическими характеристиками каскада активации системы комплемента. При этом в силу сформированного по условиям эксперимента отсутствия контакта комплемента с АОБ,

потенциально также ведущего к изменению его функциональных характеристик [6], активация данной системы происходит в не отличимом от контроля режиме.

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. No. 1. Pp. 1-31.
2. 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.
3. Вострокнутова Г.Н., Капрельянц А.С., Светличный В.А., Эль-Регистан Г.И., Шевцов В.В., Остроковский Д.Н. Мембраноактивные свойства препарата из культуральной жидкости бактерий, обладающего ауторегуляторным действием // Прикладная биохимия и микробиология. 1983. Т. 19. №4. С. 547-551.
4. Петровский А.С., Дерябин Д.Г., Лойко Н.Г., Михайленко Н.А., Кобзева Т.Г., Канаев П.А., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Регуляция алкилоксибензолами функциональной активности лизоцима // Микробиология. 2009. Т. 78. №2. С. 176-185.
5. Казацкая Ж.А., Николаева Н.В., Липова В.В., Шушпанова О.Н. Влияние алкилоксибензолов на некоторые иммунологические реакции in vitro // Паллиативная медицина и реабилитация. 2005. №1. С. 68.
6. Шушпанова О.Н. Оценка иммунотропной активности алкилоксибензолов // Материалы XV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». 2008. С. 46.
7. Дерябин Д.Г., Романенко Н.А., Эль-Регистан Г.И. Влияние алкилоксибензолов на антигенсвязывающую способность антител // Микробиология. 2009. Т. 78. №5. С. 569-574.
8. Брудастов Ю.А. Определение антикомplementарной активности бактерий по кинетике иммунного гемолиза // Вестник ОГУ. 2005. №12. С. 51-54.
9. Linko A.M., Adlercreutz H. Whole-grain rye and wheat alkylresorcinols are incorporated into human erythrocyte membranes // British Journal of Nutrition. 2005. V. 93. No. 1. Pp. 10-13.

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

Romanenko N.A., Terekhova M.S., Deryabin D.G.

ALKYLXYBENZOLS INFLUENCE ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF FC-FRAGMENTS OF ANTIBODIES

Ability of alkylxybenzols (AOB) change the functional activity of Fc-fragments of antibodies responsible for the initiation of the classical ways of complement activation is studied in the system of complement-dependent hemolysis. It is determined that in such system C6-AOB and C12-AOB but not in C1-AOB and C3-AOB have their own haemolytic effect in high concentrations. At lower concentrations C6-AOB and C12-AOB influence on the kinetic characteristics of reaction of complement-dependent hemolysis causing a time increase of lysis coming of 50% target cells without changing of lytic reaction speed.

Key words: antibodies, alkylxybenzols, Fc-fragments, complement, hemolysis.

Сведения об авторах:

Романенко Наталья Александровна старший преподаватель кафедры микробиологии
Оренбургского государственного университета
E-mail: romanenko-na@yandex.ru;

Терехова Мария Сергеевна студент кафедры микробиологии Оренбургского государственного университета

Дерябин Дмитрий Геннадьевич доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии
Оренбургского государственного университета
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: dgderyabin@yandex.ru