

## ИДИОТИП-АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ В КРОВОТОКЕ

С. А. БОБРОВНИК

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

*Рассмотрена проблема идиотип-антиидиотипического взаимодействия антител *in vivo*, а также механизм образования так называемой «прозоны», наблюдаемой в реакциях агглютинации корпускулярных антигенов сывороточными двухвалентными антителами. С помощью ранее предложенных нами координат, которые описывают взаимодействия реагентов при синхронном изменении их концентрации, проанализированы теоретические кривые зависимости концентрации свободных двухвалентных антител от разведения смеси этих антител и какого-либо блокирующего фактора. Установлено, что блокирование сывороточных антител соответствующим антигеном или же сывороточными антиидиотипическими антителами способно индуцировать формирование «прозоны». Показано, что экспериментальные кривые титрования смеси антител с соответствующим антигеном полностью совпадают с теоретическими кривыми, рассчитанными с помощью предложенной нами теории.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* антитело, антиген, антиидиотипические антитела, «прозона».

С о времени опубликования (1974) Нильсом Эрне блестящей идеи о существовании идиотип-антиидиотипической сети прошло почти сорок лет [1], и за это время данная теория временами была чрезвычайно популярной, но иногда интерес к ней заметно снижался. В последние годы снова наблюдается возросший интерес к теории идиотип-антиидиотипического взаимодействия [2–4]. Кратко напомним основные положения данной теории Эрне.

Согласно этой теории, антигенраспознающие Fv участки антител (паратопы), связывающие детерминанты чужеродного антигена (эпитопы), сами являются антигенами для организма, благодаря чему на них со временем тоже развивается иммунный ответ и к ним синтезируются специфичные антитела, которые были названы антиидиотипическими антителами [1]. Отсюда следует, что антигенраспознающие Fv участки антиидиотипических антител должны хотя бы частично напоминать структуру эпитопов антигена, к которым были направлены первичные антитела. Известно также, что на определённом этапе гуморального иммунного ответа на какой-либо антиген титры антител к этому антигену достигают максимума. Затем титры антител на-

чинают быстро снижаться, причем, по всей видимости, не только из-за приостановки синтеза этих антител клетками антителопродуцентами, но, возможно, и из-за блокирования ранее синтезированных антител соответствующими антиидиотипическими антителами. В свою очередь, к появившимся антиидиотипическим антителам со временем начинают вырабатываться свои анти-антиидиотипические антитела, тоже снижающие их активность, и так далее. В результате получается несколько волн синтеза антиантител, первоначально вызванных иммунизацией организма чужеродным для него антигеном и вследствие этого образуется своеобразная иммунологическая сеть между идиотипами и антиидиотипами.

В настоящей статье нами показано, что на поздних этапах развития гуморального иммунного ответа на определенный антиген антитела в сыворотках животных являются в значительной степени заблокированными некими сывороточными факторами. Поскольку выявить антиген в таких сыворотках не удастся, нами сделано предположение, что этим фактором являются антиидиотипические антитела и что идиотип-антиидиотипическое взаимодействие антител в сыворотке крови может быть, по крайней мере,

одним из тех индукторов, которые способны вызвать так называемый феномен «прозоны», известный науке уже более ста лет, однако так и не получивший приемлемого объяснения до настоящего времени.

### Теория

Ранее нами был предложен новый подход в изучении лиганд–рецепторного взаимодействия [5, 6] с использованием координат, отличных от так называемых координат Клотца–Скетчарда [7, 8]. Как известно, использование методологии и координат Клотца–Скетчарда позволяет оценить аффинность взаимодействия рецептора и лиганда, а также валентность рецептора. Данный подход предполагает, что в эксперименте измеряют концентрацию лиганд–рецепторного комплекса (или концентрацию свободного рецептора) для ряда образцов смеси лиганда и рецептора, находящихся в состоянии равновесия. При этом концентрация одного из реагентов (чаще рецептора) в изучаемых образцах поддерживается постоянной, а концентрация другого реагента (чаще лиганда) постепенно возрастает от нуля и до определённой величины (обычно до такой величины, когда в лиганд–рецепторной смеси после достижения равновесия в комплексе с лигандом находятся не менее 50%, а то и до 90–99% рецептора). Концентрацию образовавшегося комплекса или же концентрацию одного из реагентов, оставшихся в смеси несвязанными после достижения равновесия, измеряют, а затем при помощи соответствующих формул вычисляют константу равновесия и валентность рецептора. При подобных условиях эксперимента обычно удаётся довольно точно определить искомые параметры лиганд–рецепторного взаимодействия.

В отличие от подхода, разработанного Клотцем [7] и впоследствии модифицированного Скетчардом [8], нами был предложен принципиально иной подход для изучения лиганд–рецепторного взаимодействия, а именно метод, когда в исследуемой смеси концентрации рецептора и лиганда изменяются синхронно и определённое число раз –  $d_i$  [5, 6]. Было показано, что наш метод также позволяет определять параметры лиганд–рецепторного взаимодействия. Экспериментальные данные в данном случае следует представлять в координатах, где по оси абсцисс откладывается величина  $d_i$  или же обратная ей

величина –  $1/d_i$ , указывающая на то, во сколько раз синхронно изменилась исходная концентрация рецептора и лиганда в реакционной смеси. В связи с этим предложенную нами систему координат в дальнейшем будем называть координатами для синхронного изменения концентраций (СИК) реагентов.

Впоследствии было установлено, что предложенный нами подход в некоторых случаях имеет значительные преимущества перед традиционным методом Клотца–Скетчарда. Это связано с тем, что наш метод позволяет анализировать так называемые кривые титрования различных биологических жидкостей (сыворотка крови, слюна, моча и др.), изначально содержащих смесь определённого рецептора и соответствующего лиганда (например, смесь антител и антигена) [9]. Дело в том, что при исследовании биологических жидкостей их обычно титруют, т.е. разводят последовательно в определённое число раз, а затем определяют активность интересующих реагентов в каждом из разведений. В связи с этим наш подход, описывающий взаимосвязь между концентрацией образовавшегося лиганд–рецепторного комплекса и разведением исследуемых реагентов, оказывается очень удобным для анализа подобных кривых титрования. Остановимся кратко на основных положениях нашего метода.

Пусть в смеси какого-либо рецептора (R), и соответствующего лиганда (L), исходные концентрации которых равны соответственно  $r_0$  и  $l$ , установилось динамическое равновесие между концентрацией образовавшегося лиганд–рецепторного комплекса ( $c$ ) и концентрациями этих реагентов, не связавшихся друг с другом, которые после достижения равновесия стали равны:  $r_0 - c$  и  $l - c$ . Тогда согласно закону действия масс между константой равновесия данной реакции ( $K$ ) и концентрациями образовавшегося комплекса и свободных реагентов существует следующее соотношение:

$$K = \frac{c}{(l - c)(r_0 - c)}. \quad (1)$$

Предложенная нами идея состоит в том, что если концентрацию смеси реагентов уменьшить (или увеличить) в  $d_i$  раз, то концентрация образовавшегося комплекса тоже изменится и станет равной некой величине  $c_i$ , которая сложным образом зависит от  $d_i$ . Очевидно, что при

этом полная концентрация рецептора и лиганда в данной смеси уменьшится (или увеличится) ровно в  $d_i$  раз и станет равной  $r_0/d_i$  (или  $r_0 \times d_i$ ) и  $l/d_i$  (или  $l \times d_i$ ), соответственно. Следовательно, если данную лиганд–рецепторную смесь развести в  $d_i$  количество раз, то уравнение (1) должно быть преобразовано следующим образом:

$$K = \frac{c_i}{\left(\frac{l}{d_i} - c_i\right)\left(\frac{r_0}{d_i} - c_i\right)}. \quad (2)$$

Очевидно, что в случае, если концентрация лиганда ( $l$ ) значительно превосходит концентрацию образовавшегося комплекса ( $c$ ), тогда для величин, представляющих собой разность  $l-c$  в уравнении (1) или  $l/d_i - c_i$  в уравнении (2), можно пренебречь величиной  $c$  (или  $c_i$ ), т.е.  $l-c \approx l$  (или  $l/d_i - c_i \approx l$ ), что приведет к значительному упрощению уравнений (1) и (2). Этот прием упрощения уравнения (1) обычно используется в подавляющем большинстве экспериментальных исследований. Очевидно, что мы тоже можем воспользоваться этим приемом для аналогичного упрощения уравнения (2).

Ранее было показано, что предложенная нами теория позволяет анализировать кривые титрования биологических жидкостей в координатах СИК, а также осуществлять линеаризацию экспериментальных кривых титрования, что позволяет определять в эксперименте параметры лиганд–рецепторного взаимодействия [10, 11]. Помимо этого, нами было продемонстрировано [11], что в том случае, если рецептор является двухвалентным (к примеру, если это двухвалентное антитело), а  $l/d_i - c_i \approx l$ , то после достижения состояния равновесия в лиганд–рецепторной смеси вероятность  $f_1$  того, что оба паратопа любого из антител связаны с моновалентным антигеном, будет равна:

$$f_1 = \frac{l^2 K^2}{(d_i + lK)^2}, \quad (3)$$

а вероятность того, что оба паратопа данного антитела будут свободны (т.е. не связаны с антигеном) равна:

$$f_2 = \frac{d^2}{(d_i + lK)^2}. \quad (4)$$

Отсюда следует, что вероятность того, что только один из двух паратопов антитела связан с антигеном, а другой является свободным, равна:

$$f_3 = 1 - f_1 - f_2 = 1 - \frac{l^2 K^2}{(d_i + lK)^2} - \frac{d^2}{(d_i + lK)^2} = \frac{2dlK}{(d_i + lK)^2}. \quad (5)$$

Умножив вычисленные нами вероятности, которые представлены в уравнениях (3)–(5), на концентрацию двухвалентного рецептора (или антитела) в растворе, можно легко найти концентрации каждого варианта состояния рецептора после достижения в данной системе состояния равновесия, т.е. концентрации полностью свободного, наполовину или же полностью заблокированного лигандом рецептора в данной лиганд–рецепторной смеси.

С помощью этого подхода и проведенных теоретических расчетов ранее нами было показано [12], что для любой смеси двухвалентных антител с моновалентным антигеном зависимость концентрации несвязанных с антигеном (т.е. оставшихся полностью свободными двухвалентных антител) от разведения этой смеси представлена кривой, которая имеет ярко выраженный пик при разведениях смеси в 4–8 или даже более раз. Иными словами, впервые нами было продемонстрировано то, что реакция агглютинации бактерий, зависящая, в основном, от концентрации двухвалентных антител с незаблокированными обоими паратопами, при небольших разведениях должна демонстрировать феномен «прозоны». Таким образом, феномен «прозоны» в реакции агглютинации впервые получил математическое обоснование [12].

Вместе с тем, наша прошлая попытка исследовать феномен «прозоны» с помощью упомянутого выше подхода имела некоторые недостатки. Во-первых, использовавшиеся нами уравнения (3)–(5) являются приближительными и имеют высокую точность только для тех случаев, когда концентрация антигена (или иного сывороточного фактора, который блокирует антитела) заметно превышает концентрацию антител (т.е. точные только при  $l-c \approx l$  и  $l/d_i - c_i \approx l$ ), что вряд ли имеет место в реальной ситуации. К тому же наши попытки в эксперименте обнаружить при-

сутствие блокирующего антигена в сыворотках, которые были способны формировать «прозону» в реакции агглютинации, не увенчались успехом, тогда как, согласно нашим теоретическим расчётам, «прозона» может формироваться только в избытке моновалентного антигена или иного блокирующего фактора.

Во-вторых, некоторые закономерности, наблюдаемые при появлении или исчезновении «прозоны», наша предложенная ранее теория не могла объяснить. В частности, не было ответа на вопрос, почему смесь из 3–5 антисывороток, каждая из которых способна формировать выраженную «прозону» в реакции агглютинации, как правило не формировала такой прозоны. В связи с этим настоящая попытка предпринята нами с целью объяснить феномен «прозоны», которая не имела бы упомянутых выше недостатков. Во-первых, в настоящей работе мы использовали для расчетов не приблизительные (3)–(5), а точные формулы (см. ниже), описывающие концентрации свободных или наполовину заблокированных антител в смеси с блокирующими факторами или антигенами. Во-вторых, в этой работе мы предполагаем, что сывороточным блокирующим фактором могут быть антиидиотипические антитела, а не антиген или неизвестный блокирующий фактор, присутствующий в антисыворотке.

Вначале рассмотрим, как можно рассчитать точные концентрации свободных, наполовину или полностью заблокированных двухвалентных рецепторов в их смеси с моновалентным лигандом для заданных значений константы аффинности и концентраций лиганда и рецептора. Для этого решим квадратное уравнение (2) относительно величины  $c_i$  и получим, что концентрацию отдельных паратопов, связавших антиген, т.е. значение величины  $c_p$ , можно вычислить с помощью уравнения (6).

Отыскав величину  $c_i$  с помощью уравнения (6), можно рассчитать точные значения  $f_1$ ,  $f_2$  и  $f_3$  следующим образом. Например, если смесь рецептора с лигандом развести в  $d_i$  раз, тогда концентрация лигандсвязывающих центров станет равной  $r_0/d_i$ . Следовательно после достижения

$$c_i = \frac{d_i l K + d_i r_0 K + d_i^2 - \sqrt{(d_i l K + d_i r_0 K + d_i^2)^2 - 4 d_i^2 l r_0 K^2}}{2 d_i^2 K} \quad (6)$$

равновесия вероятность того, что любой связывающий центр рецептора связан с лигандом будет равной  $f = c_i r_0 / d_i = c_i d_i / r_0$ , а вероятность того, что оба центра любого рецептора связаны с лигандом, равна квадрату этой величины, т.е.

$$f_1 = \frac{c_i^2 d_i^2}{r_0^2} \quad (7)$$

С другой стороны, вероятность того, что не один из двух, а оба рецептора (или паратоп антитела) является свободными, а не заблокированными антигеном или иным блокирующим фактором равна  $1-f = 1-c_i d_i / r_0 = (r_0 - c_i d_i) / r_0$ . Поскольку вероятность того, что оба связывающих центра любой молекулы двухвалентного рецептора ( $f_2$ ) являются свободными, равна квадрату найденной величины, тогда получим:

$$f_2 = \frac{(r_0 - c_i d_i)^2}{r_0^2} \quad (8)$$

И, наконец, вероятность ( $f_3$ ) того, что после достижения равновесия один из связывающих центров двухвалентного рецептора является свободным, а другой связан с лигандом, будет равна  $1-f_1-f_2$ , т.е.:

$$f_3 = 1 - \frac{c_i^2 d_i^2}{r_0^2} - \frac{(r_0 - c_i d_i)^2}{r_0^2} = \frac{2 c_i d_i (r_0 - c_i d_i)}{r_0^2} \quad (9)$$

Если полученные в уравнениях (7)–(9) значения вероятностей умножить на концентрацию рецептора, разведенную в  $d_i$  раз, т.е. на величину  $r_0/d_i$ , тогда мы получим концентрации каждого из комплексов рецептора с лигандом для данной смеси, а именно концентрацию полностью свободного рецептора, концентрацию полностью связанного с лигандом рецептора или концентрацию рецепторов, наполовину свободных, а наполовину заблокированных лигандом. Отметим, что найденные таким способом, т.е. с помощью уравнений (7)–(9), концентрации частично или полностью заблокированных рецепторов в смеси с лигандом являются точными в отличие

от концентраций этих величин, найденных с помощью приближительных уравнений (3)–(5).

К сказанному выше необходимо добавить следующее. Поскольку при помощи иммуноэнзимного анализа (ИЭА) определяют величину, пропорциональную количеству антител, у которых один или оба паратопа свободны, то чтобы отыскать теоретическое значение этой величины, нам нужно сложить вероятности  $f_2$  и  $f_3$ , а затем умножить на концентрацию антител ( $r_0/d_i$ ). С другой стороны, эту же величину мы получим, если от единицы отнимем  $f_1$  – вероятность того, что оба паратопа антитела заблокированы антигеном. В обоих случаях получим одну и ту же величину, поскольку

$$f_2 + f_3 = 1 - f_1 = 1 - \frac{c_i^2 d_i^2}{r_0^2} = \frac{r_0^2 - c_i^2 d_i^2}{r_0^2}. \quad (10)$$

Умножив полученную в уравнении (10) величину вероятности того, что, по крайней мере, один из паратопов свободен, на концентрацию антител  $r_0/d_i$ , получим теоретическое значение концентраций антител в смеси с антигеном, определяемых с помощью ИЭА. Следовательно, с помощью уравнения (10) легко могут быть вычислены теоретические кривые, получаемые при титровании методом ИЭА, смеси антител с антигеном.

### Материалы и методы

В работе использовали такие реагенты: овалбумин (ОВА), моноклональные антитела к ОВА, козьи антитела к IgG мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена (все реактивы Sigma, США). В качестве субстрата для иммуноэнзимной реакции использовали орто-фенилендиамин (Sigma, США), а также перекись водорода (Тернофарм, Украина).

Для получения антисывороток к ОВА внутрибрюшинно иммунизировали мышей BALB/c (0,3 мл раствора ОВА в физиологическом растворе NaCl, по 300 мкг/мышь). Спустя три недели после первой иммунизации, такой же дозой того же антигена животных повторно иммунизировали, а спустя еще три недели после повторной иммунизации мышей забивали с помощью дислокации шейных позвонков, декапитировали, кровь собирали в отдельные пластиковые пробирки и стандартным способом получали сыворотку, которую замораживали и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ , размораживая непосредственно пе-

ред использованием их в опытах по титрованию с помощью иммуноэнзимного анализа (ИЭА).

Овальбумин сорбировали на плашках (Dynatech, США), инкубируя раствор ОВА (10 мкг/мл в фосфатном буфере, pH 7,4, по 0,1 мл на лунку) при  $4^\circ\text{C}$  в течение суток, после чего плашки непосредственно перед опытом тщательно отмывали в проточной воде и затем использовали для исследований методом ИЭА. Образцы антисывороток или моноклональных антител, разведенные в определенное количество раз, помещали в лунки плат с сорбированным ОВА, платы инкубировали в течение часа при постоянном перемешивании на шейкере (Dynatech, США), а затем тщательно отмывали проточной водой от несвязавшихся антител и добавляли козьи анти-IgG антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Плашки инкубировали с указанным конъюгатом в течение 1 ч при  $4^\circ\text{C}$ , после чего тщательно промывали и добавляли субстрат пероксидазы, а именно смесь ортофенилендиамина (1 мг/мл) и 0,003%-го  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После развития окраски субстрата реакцию останавливали добавлением к каждой лунке 0,06 мл 2 М серной кислоты и измеряли абсорбцию содержимого лунок плашек на микрофотоколориметре (ELx800, BIO-ТЕК) при длине волны 490 нм.

### Результаты и обсуждение

При титровании с помощью метода агглютинации специфичных к бактериальным клеткам антисывороток очень часто наблюдается так называемый феномен «прозоны» [13, 14]. Он состоит в том, что при начальных разведениях сывороток (1 : 2 и/или 1 : 4) в большинстве случаев агглютинация бактерий отсутствует, тогда как при дальнейшем разведении (1 : 8, 1 : 16 и т.д.) тех же сывороток агглютинация бактерий происходит вполне успешно (таблица). В конце концов, дальнейшее разведение антисыворотки приводит к такому снижению концентрации антител, когда они становятся неспособны осуществлять агглютинацию бактерий.

Очевидно, что представленный в таблице результат титрования антисыворотки является парадоксальным, поскольку антисыворотка при меньших разведениях, а именно 1 : 2 или 1 : 4, (т.е. при большей концентрации антител) не агглютинирует бактерии, но зато успешно агглютинирует при более высоких разведени-

*Влияние разведения антисыворотки к инактивированным нагреванием бактериальным клеткам Staphylococcus aureus (штамм Wood 46) на степень агглютинации бактерий этой антисывороткой*

Разведение	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512
Антисыворотка	-	+-	+++	++++	++++	++++	++++	++++	-
Очищенные антитела	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
Смесь четырех антисывороток	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-

Примечание: Наиболее выраженная агглютинация наблюдается в лунках, обозначенных знаком «++++», а менее выраженная – знаком «+++»; чуть заметная агглютинация обозначена знаком «+-», а знак «-» обозначает отсутствие агглютинации.

ях 1 : 8, 1 : 16 и т.д. Вместе с тем подобный результат является типичным в подобных реакциях. Этот, так называемый, феномен «прозоны» пытались объяснить с помощью самых разнообразных предположений. Наиболее популярными из этих объяснений были предположения о «растворении» комплексов антиген–антитело при большом избытке антител или же предположение о наличии в антисыворотках одновалентных антител, которые при небольших разведениях блокируют антигены бактерий и, тем самым, не позволяют двухвалентным антителам агглютинировать данные бактерии. Однако тот факт, что раствор очищенных антител такого же титра, как и антисыворотка, никогда не дает феномен «прозоны», указывает на то, что гипотеза о «растворении» комплекса антиген–антитело в избытке сывороточных антител вряд ли способна объяснить данный феномен.

Не выдерживает экспериментальной проверки также и гипотеза о наличии в сыворотке огромного количества одновалентных антител, способных заблокировать поверхностные антигены бактерий и таким путём воспрепятствовать двухвалентным антителам агглютинировать эти бактерии. Таким образом, феномен «прозоны» фактически остается без приемлемого объяснения вот уже более ста лет. Вместе с тем, при помощи нашей теории и представления кривых титрования в координатах СИК нами недавно было продемонстрировано [12], что присутствие в сыворотке факторов, способных блокировать отдельные паратопа антител, неминуемо должно вызывать эффект «прозоны».

А теперь предположим, что факторами, блокирующими отдельные паратопа антител, являются не антигены, а антиидиотипические

антитела, способные подавлять активность первичных антибактериальных антител. Как будет видно из дальнейшего, это предположение позволяет не только объяснить характерную для «прозоны» количественную взаимосвязь между концентрацией свободных двухвалентных антител в антисыворотке и ее разведением, но и тот факт, что смесь нескольких антисывороток в большинстве случаев не может формировать «прозону», хотя каждая из сывороток в отдельности обладает выраженным эффектом «прозоны».

Рассмотрим вначале в координатах СИК теоретические кривые зависимости концентрации антител, которые способны связываться с антигеном в их смеси с антигеном от разведения этой смеси,  $d_i$ , или обратной величины,  $1/d_i$ . Иными словами, это те антитела, у которых или один, или оба паратопа свободны, а не связаны с антигеном. Эти кривые можно легко рассчитать с помощью уравнения (10) для произвольно выбранных значений концентраций реагентов и величин аффинности взаимодействия антитела с антигеном (или рецептора с лигандом). В случае, когда в данном растворе антител имеется антиген, способный блокировать эти антитела, то кривые отклоняются от прямой линии в сторону оси абсцисс (рис. 1), причем тем больше отклоняются, чем выше концентрация блокирующего антигена в смеси с антителами. Отметим (см. ниже), что подобные кривые получаются и в эксперименте при титровании антисывороток или же при титровании раствора очищенных антител, к которому добавлены различные концентрации антигена.

С помощью уравнения (8) можно вычислить зависимость от разведения  $d_i$  концентрации антител, у которых оба паратопа являются свобод-

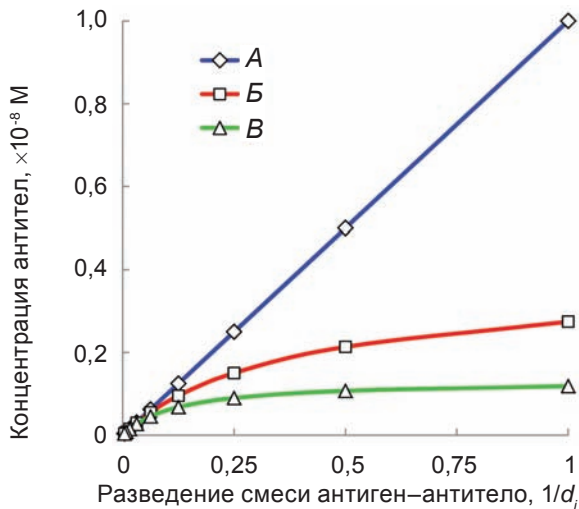


Рис. 1. Теоретические кривые зависимости концентрации двухвалентных антител, у которых один или оба паратопа свободны в смеси этих антител с антигеном, от разведения,  $d_i$ , этой смеси в 2, 4, 8 и т.д. раз. Расчеты сделаны для следующих параметров взаимодействия антиген–антитело: константа равновесия реакции антиген–антитело,  $K = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ; концентрация антител в неразведенной смеси,  $r_0 = 1,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ; концентрация антигена в смеси с антителами (до разведения этой смеси): А – антиген отсутствует, т.е.  $l_1 = 0 \text{ M}$ ; Б –  $l_2 = 2,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ; В –  $l_3 = 4,0 \times 10^{-8} \text{ M}$

ными (рис. 2). Как видно из рисунка, кривые зависимости концентрации полностью свободных антител от разведения смеси антиген–антитело имеют выраженный пик. Это значит, что в реакциях, для которых требуются двухвалентные антитела (например, реакция агглютинации) в подобных случаях может формироваться «прозона», т.е. при небольших разведениях антисыворотки концентрация антител с незаблокированными обоими паратопами является меньшей, по-видимому, недостаточной для агглютинации, чем при более высоких разведениях.

Теперь сравним, как изменяются теоретические кривые титрования, если для расчетов воспользоваться уравнением (4) или уравнением (8), первое из которых является округленным и дает точные значения величины  $f_2$  только при большом избытке антигена. Оказывается, что рассчитанные с помощью этих уравнений теоретические кривые заметно различаются между собой только при небольших значениях величины  $d_i$  (рис. 3), а при увеличении  $d_i$  кривые прак-

тически полностью совпадают. Для нас, однако, важно то, что степень выраженности «прозоны» ничуть не меньше для кривой, вычисленной с помощью точного (8), чем с помощью приближенного уравнения (4). Это свидетельствует о том, что ранее сделанные нами выводы относительно возможного механизма формирования «прозоны» блокирующими факторами [12] являются полностью правильными, несмотря на то, что в предыдущей работе для расчета теоретических кривых мы использовали приближенное (4), а не точное уравнение (8).

Таким образом, присутствие в сыворотке любых факторов, способных блокировать антитела, может приводить к формированию «прозоны» в иммунологических реакциях, в которых требуется активность двухвалентных антител. Очевидно, что описанный выше механизм образования «прозоны» может быть индуцирован как присутствием антигена в смеси с антителами, так и наличием антиидиотипических антител. Однако поскольку антиген в концентрациях, достаточных для образования «прозоны» в иммунологических реакциях, как

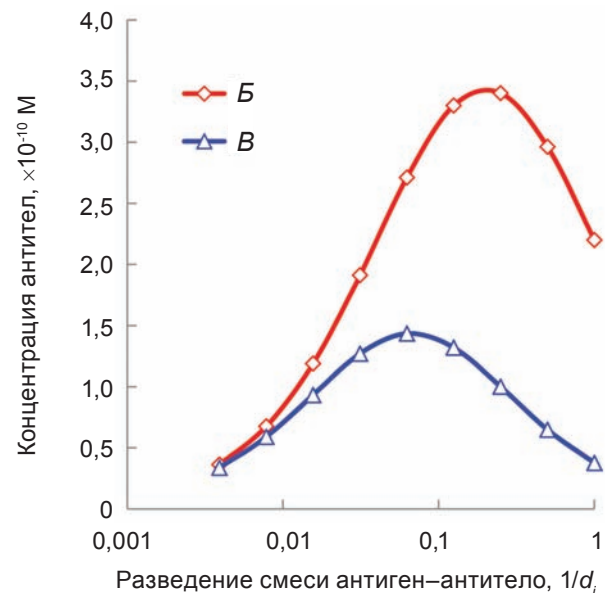


Рис. 2. Теоретические кривые зависимости концентрации двухвалентных антител, у которых оба паратопа свободны в смеси этих антител с антигеном, от разведения,  $d_i$ , данной смеси в 2, 4, 8 и т.д. раз. Расчеты сделаны для тех же параметров взаимодействия антиген–антитело, что и на рис. 1. Ось абсцисс представлена в логарифмическом масштабе

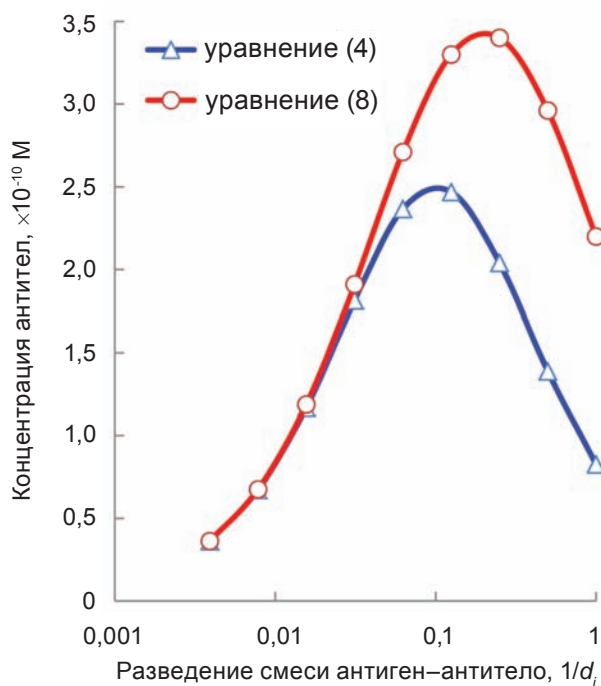


Рис. 3. Теоретические кривые зависимости концентрации свободных двухвалентных антител в их смеси с антигеном от разведения этой смеси в  $d_i$  раз. Расчеты концентрации свободных антител сделаны с помощью приблизительного (4) или точного (8) уравнения для тех же параметров взаимодействия антиген-антитело, что и на рис. 1

правило, не обнаруживается в антисыворотках или иных биологических жидкостях, то более вероятной причиной формирования «прозоны», на наш взгляд, являются антиидиотипические антитела. Более того, именно предположение о блокировке антител антиидиотипическими антителами позволяет также объяснить и иной феномен, который невозможно объяснить, если бы блокирующим фактором антител являлся соответствующий антиген. Здесь мы имеем ввиду тот трудно объяснимый факт, что, как правило, смесь нескольких антисывороток не способна формировать «прозону» при титровании этой смеси, хотя каждая из антисывороток по отдельности формирует выраженную «прозону». Рассмотрим, почему может произойти подобное явление и каков его механизм.

Итак, как уже говорилось выше, наиболее вероятным кандидатом, способным индуцировать образование феномена «прозоны», скорее всего, являются антиидиотипические антитела.

Известно, что антиидиотипические антитела одного индивида могут не реагировать с антителами другого индивида, хотя антитела обеих особей являются специфичными к одному и тому же антигену. Из этого факта следует, что если смешать две или более сывороток вместе (например, смешать равные их количества для упрощения расчётов), то концентрации всех компонентов каждой из сывороток уменьшатся во столько раз, сколько сывороток было смешано. Например, если смешали две (три, четыре или более антисывороток), то концентрации антител каждой из антисывороток, как и концентрации антиидиотипических антител, также уменьшатся в два (три, четыре или более) раз. Следовательно, используя уравнение (8), мы можем легко вычислить, как изменяются концентрации двухвалентных антител, незаблокированных индивидуальными антиидиотипическими антителами, в полученной смеси в зависимости от количества смешанных антисывороток.

Для проведения расчетов можно предположить, что в исходных сыворотках имеется  $1,0 \times 10^{-8}$  М антител и  $2,0 \times 10^{-8}$  М антиидиотипических антител, которые реагируют друг с другом с константой аффинности, например,  $K = 5 \times 10^8$  М<sup>-1</sup>. После смешивания равных объемов двух (трех или четырех) сывороток каждый из компонентов этих сывороток будет разведен в два (или, соответственно, в три или четыре) раза. Если антитела к антигену одной сыворотки и антиидиотипические антитела из другой сыворотки не реагируют друг с другом, то в этом случае количество антител, заблокированных антиидиотипическими антителами, заметно снизится после смешивания антисывороток, а количество свободных антител резко возрастет. Ясно, что в этом случае создадутся условия, когда эффект «прозоны» должен исчезнуть. Для демонстрации этого утверждения проведем математический расчет концентраций антител, у которых оба паратопа свободные в смеси из четырех антисывороток, смешанных в равных объемах.

Итак, если в каждой антисыворотке имеются указанные выше концентрации антител и антиидиотипических антител с указанной константой аффинности взаимодействия, то с помощью уравнения (8) можно вычислить, что в исходном состоянии около 0,38% антител являются полностью незаблокированными. Только



эти полностью свободные двухвалентные антитела способны агглютинировать корпускулярный антиген. Однако после смешивания четырех антисывороток, у которых антиидиотипические антитела реагируют только со своими собственными антителами, в полученной смеси каждая из четырех антисывороток будет содержать уже не 0,38, а 1,0% свободных двухвалентных антител, т.е. в 2,5 раза больше. К тому же напомним, что каждая из антисывороток будет содержать указанную часть свободных антител, а все вместе они будут иметь примерно 4,0% двухвалентных антител, способных агглютинировать антиген. Следовательно, в результате смешивания четырех антисывороток концентрация свободных антител увеличится более чем в десять раз (рис. 4) и, как следствие, такое количество антител может оказаться вполне достаточным для агглютинации антигена, а значит для исчезновения эффекта «прозоны», наблюдавшейся при титровании исходных сывороток.

Необходимо отметить, что полученные результаты важны не только для понимания механизма образования «прозоны», но и для представления о том, в каком состоянии находятся циркулирующие в крови человека и животных антитела, выработанные иммунной системой в ответ на антигенный стимул. Из всего сказанного выше следует, что через некоторое время после достижения максимальных титров большая часть циркулирующих антител является, по видимому, неактивными вследствие их блокировки антиидиотипическими антителами. Поскольку с помощью ИЭА мы выявляем не только антитела, у которых оба паратопа свободны, но и антитела с заблокированным одним из паратопов, то с помощью ИЭА более сложно получить типичный эффект «прозоны», представленный в таблице и на рис. 2, для которого требуются двухвалентные антитела. В случае использования ИЭА, как уже говорилось выше, кривые титрования антител будут похожими на кривые *Б* или *В*, представленные на рис. 1.

Отметим, что теоретические кривые, представленные на рис. 1, позволяют легко определить, сколько антител в смеси с антигеном или с антиидиотипическими антителами являются свободными. Например, на рис. 1, кривая *В*, в исходном состоянии (т.е. до разведения) чуть меньше 12% антител имеют один или оба паратопа свободными, тогда как более 88% являются

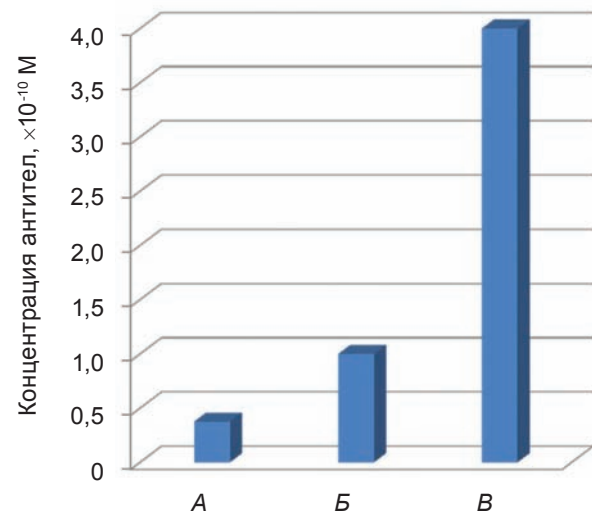


Рис. 4. Влияние смешивания четырех антисывороток, каждая из которых содержит блокирующий фактор и способна формировать «прозону», на концентрацию свободных двухвалентных антител в полученной смеси. А – концентрация свободных антител в исходной сыворотке; Б – концентрация свободных антител каждой из сывороток после смешивания четырех антисывороток; В – суммарная концентрация свободных антител в смеси четырех антисывороток. Расчеты сделаны для тех же параметров взаимодействия антиген–антитело, что и на рис.1, при  $l_2 = 2,0 \times 10^{-8}$  М

полностью заблокированными. Разведение данного образца приводит к тому, что часть разблокированных антител увеличивается (например, при разведении 1 : 16 их уже почти 73%, хотя общая концентрация этих активных антител в растворе снижается из-за 16-кратного разведения раствора).

В связи с вышеизложенным, закономерно возникает вопрос о том, действительно ли антитела сыворотки животного или человека через определенное время после иммунизации в основном становятся заблокированными некими сывороточными факторами? Чтобы проверить этот вывод мы титровали с помощью ИЭА сыворотки трех мышей, кровь у которых была взята через 21 сутки после двукратной иммунизации ОВА (рис. 5), т.е. через несколько дней после достижения максимальных титров. Как видно из рисунка, кривые титрования мышей действительно напоминают теоретические кривые, представленные на рис. 1. При этом кривая

титрования мыши № 3 имеет наибольший угол наклона, т.е. ее антитела наименее заблокированные сывороточными факторами. Кривая титрования сыворотки № 1 наоборот имеет малый угол наклона и почти параллельна оси абсцисс при низких разведениях. Кривая титрования сыворотки № 2 занимает промежуточное положение. Это свидетельствует о том, что сыворотка мыши № 1 содержит наибольшую концентрацию фактора (или факторов), способных блокировать антитела к ОВА, т.е. по-видимому, антиидиотипических антител.

Еще одним экспериментальным подтверждением данной теории является тот факт, что экспериментальные кривые титрования смеси моноклональных антител, специфичных к ОВА, с разными концентрациями ОВА (рис. 6) напоминают теоретические кривые, представленные на рис. 1, а также кривые титрования мышинных сывороток (рис. 5). Как видно из рис. 6, кривые титрования смесей антиген–антитело зависят от концентрации имеющегося в смеси антигена, причём все происходит точно в соответствии с предсказаниями нашей теории.

Если сывороточные антитела являются в большей или меньшей степени заблокированными

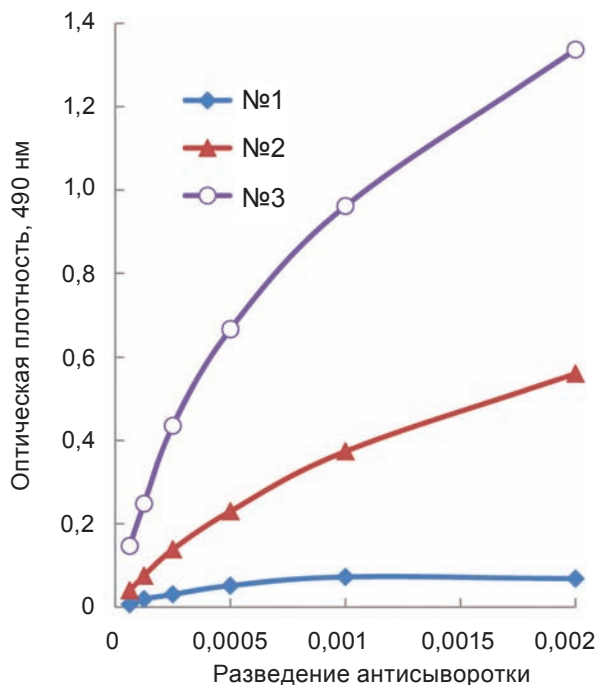


Рис. 5. Кривые титрования сывороток трех мышей BALB/c, двукратно иммунизированных ОВА. Сыворотка получена через три недели после второй иммунизации

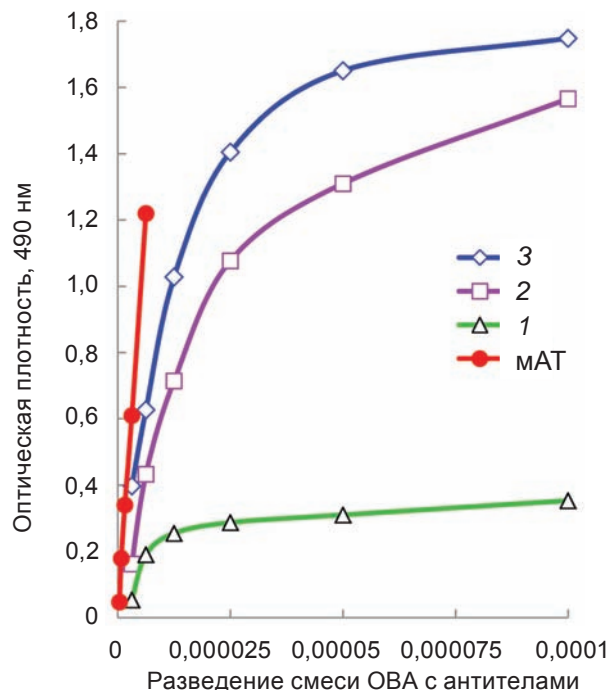


Рис. 6. Кривые титрования смесей различных концентраций ОВА и одинаковой концентрации моноклональных антител. Концентрация ОВА в образце 1 – 8,0 мг/мл; в образце 2 – 0,8 мг/мл; в образце 3 – 0,08 мг/мл; МАТ – образец не содержит ОВА

ными сывороточными факторами (согласно нашему предположению, антиидиотипическими антителами), то в связи с обратимостью данной реакции длительная инкубация (в течение суток и более) многократно разведенных сывороток должна привести к разблокированию части антител и, следовательно, к выраженному усилению их активности. В отличие от сывороток, сходное разведение и последующая инкубация моноклональных антител не должны приводить к заметному изменению их активности. Такие опыты нами тоже были проведены и их результат полностью подтвердил предсказания нашей теории. Как видно из рис. 7, инкубация разведенных моноклональных антител действительно не приводит к изменению их активности, тогда как инкубация разведенных сывороток индуцировала существенное повышение активности этих сывороток в отношении антигена. Эти результаты еще раз подтверждают выводы, сделанные нами на основании анализа, проведенного с помощью координат СИК, относительно возможного механизма возникновения «прозоны» при

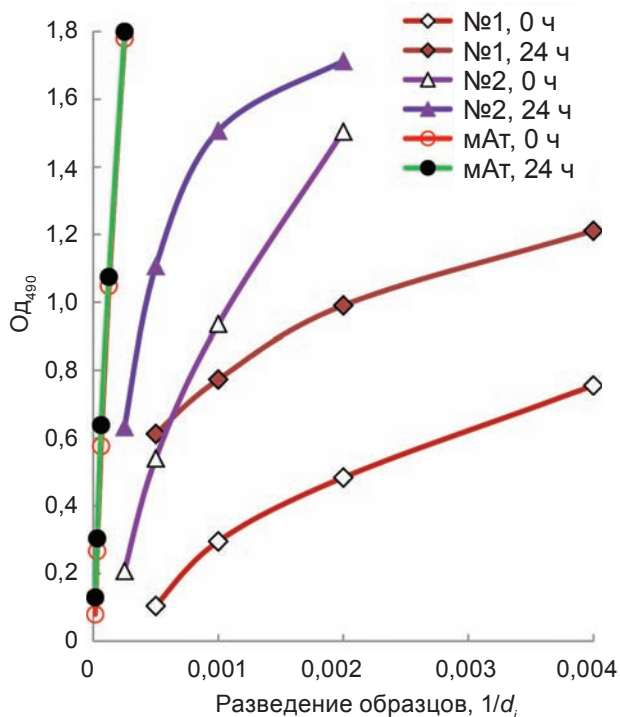


Рис. 7. Влияние инкубации в течение 24 час при 4 °C предварительно разведенных в 250–4000 раз образцов антисывороток мышей № 1 и № 2, а также специфичных к ОВА моноклональных антител на способность антител связываться с сорбированным на плашке ОВА

титруванні антисывороток, а також о блокуванні сывороточних антител антиидіотипічними антителами.

Таким образом, убедительно продемонстрировано, что использование предложенных нами ранее координат СИК позволяет проанализировать кривые титрования антисывороток и выявить ряд закономерностей в изменении активности сывороточных антител в зависимости от разведения исследуемых образцов. Показано, что наличие в сыворотках любых факторов, способных блокировать один из паратопов антител, может приводить к возникновению феномена «прозоны». Кривые титрования антител с помощью ИЭА обладают тем меньшим углом наклона по отношению к оси абсцисс, чем большая концентрация блокирующего фактора (антигена или антиидіотипічских антител) находится в смеси с антителами. Разведение и последующая длительная инкубация подобных образцов антител, находящихся в комплексе с блокирующими факторами, приводит к диссоциации иммунных комплексов и, как следствие, к повышению ак-

тивности данных антител. Установлено также, что большинство циркулирующих в крови антител в отдалённые периоды после антигенного стимула являются заблокированными, по всей видимости, антиидіотипічскими антителами.

## ІДІОТИП-АНТИІДОТИПІЧНА ВЗАЄМОДІЯ АНТИТІЛ У КРОВОТОЦІ

С. А. Бобровник

Институт биохимии им. О. В. Палладина  
НАН Украины, Київ;  
e-mail: s-bobrov@bk.ru

Розглянуто проблему утворення так званої «прозони» в реакціях аглютинації корпускулярних антигенів сироватковими двовалентними антитілами. За допомогою раніше запропонованих нами координат, що описують закономірності взаємодії реагентів за синхронної зміни їх концентрації, нами проаналізовано теоретичні криві залежності концентрації вільних двовалентних антитіл від розведення суміші антитіл і деякого блокуючого фактора. Показано, що блокування сироваткових антитіл відповідним антигеном або сироватковими антиідіотипічними антитілами може індукувати формування «прозони». Також встановлено, що експериментальні криві титрування суміші антитіл із відповідним антигеном збігаються з теоретичними кривими, розрахованими за допомогою запропонованої нами теорії. Одержані дані також свідчать, що після того, як максимальне антитілоутворення залишилось в минулому, значна частина сироваткових антитіл стає заблокованими антиідіотипічними антитілами.

**Ключові слова:** антитіло, антиген, антиідіотипічні антитіла, «прозона».

## IDIOTYPE-ANTIDIOTYPIC INTERACTION OF ANTIBODIES IN THE BLOODSTREAM

S. A. Bobrovnik

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

A problem of «prozone» formation in agglutination of corpuscular antibodies by bivalent antibodies was considered. Using a new coordinate system, which was proposed by us earlier, we

analyzed theoretical and experimental curves that describe relations between bivalent antibody concentration and some blocking factors. It was shown that occupation of antibody paratopes by a blocking factor or by antiidiotypic antibodies can induce «prozone» formation. It was also demonstrated that experimental titration curves for a mixture of antibodies and corresponding antigens coincide with theoretical curves that were calculated according to our theory. Our data also demonstrate that major part of serum antibodies are blocked by antiidiotypic antibodies when maximum of antibody formation is over and antibody titers come down.

**Key words:** antibody, antigen, antiidiotypic antibodies, «prozone».

1. *Jerne N. K.* // *Ann. Immunol. (Paris)*. – 1974. – **125C** (1–2). – P. 373–389.
2. *Behn U.* // *Immunol. Rev.* – 2007. – **216**. – P. 142–152.
3. *Lee G., Ge B.* // *Cancer Immunol. Immunother.* 2010. – **59**. – P. 1347–1356.
4. *Gómez R. E., Ardigo M. L.* // *Front. Oncol.* – 2012. – **2**. – P. 147.
5. *Бобровник С. А.* // *Укр. біохім. журн.* – 1999. – **71**, № 5. – С. 110–122.
6. *Bobrovnik S. A.* // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2003. – **55**. – P. 71–86.
7. *Klotz I. M.* // *Arch. Biochem.* – 1946. – **9**. – P. 109–116.
8. *Scatchard G.* // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1949. – **51**. – P. 660–672.
9. *Bobrovnik S. A.* // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 1. – P. 107–114.
10. *Bobrovnik S. A.* // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – **74**, N 5. – P. 128–132.
11. *Bobrovnik S. A.* // *J. Biochem. Biophys. Methods*. – 2005. – **65**. – P. 30–44.
12. *Bobrovnik S. A.* // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 2. – P. 113–118.
13. *Бобровник С. А.* // *Доп. АН УРСР.* – 1986. – № 10. – С. 49–51.
14. *Бобровник С. А.* // *Журн. мікробиол. епідеміол. іммунобіол.* – 1988 – № 3. – С. 57–61.

Получено 15.04.2013