

Метрология, стандартизация, контроль

УДК 616-097.3

Н.Г. ТИТОВА

ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова», Москва, 105064

e-mail: ng_titova@mail.ru

Закономерности взаимодействия специфических сывороточных антител с антигенами, иммобилизованными на поверхности твердой фазы. Авидность и аффинность антител

В обзоре проанализированы исследования по определению авидности IgG-антител в сыворотках пациентов методом твердофазного ИФА. Анализ проведен с позиции ранее выявленных авторами закономерностей специфического связывания антигена при ИФА компонентов из смесей ксеногенных антител одинаковой специфичности к антигену при варьирующем соотношении их концентраций. Такой подход позволил дать новую трактовку наблюдаемых явлений. Проведенный анализ показал, что используемый тест демонстрирует наличие или отсутствие преобладания в испытываемых сыворотках антител IgM-изотипа над антителами IgG, а не авидность последних. Обсуждается вопрос о современном понимании терминов авидности и аффинности антител.

Ключевые слова: антитела, авидность, аффинность, адсорбция, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), цитомегаловирус (CMV).

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-38-48

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) нашел широкое применение в научных исследованиях и в практической медицине. Он используется для диагностики ряда вирусных заболеваний (корь, краснуха, цитомегаловирусная инфекция и др.), отличительным признаком которых принято считать появление в крови так называемых малоавидных антивирусных антител IgG-изотипа. Разработаны коммерческие диагностические тест-системы, позволяющие выявлять противовирусные малоавидные антитела указанного изотипа в сыворотках крови на ранних стадиях заболевания, что обеспечивает его более благоприят-

ные течение и исход [1—6]. Однако широкое использование таких тест-систем позволило выявить ряд противоречивых явлений, еще не нашедших объяснения, что вызывает разную оценку диагностической ценности таких систем при определении авидности антител IgG-изотипа [7].

В частности, возникает ряд следующих вопросов по поводу возможности использования и объективной интерпретации результатов, полученных данным методом:

1. Почему, как правило, данный тест пригоден только для анализа сывороток больных при заболеваниях, характеризующихся быстрым перво-

Титова Нина Григорьевна, ведущий научный сотрудник, кандидат медицинских наук.

Список сокращений: Ag — антиген; AT — антитело; ИА — индекс авидности; ИФА — иммуноферментный анализ; моноАТ — моноклональные антитела; ОП — оптическая плотность; ПДС — стандартная лошадиная противодифтерийная сыворотка; ФСБ — фосфатно-солевой буфер; МЕ — международная единица активности; CMV (cytomegalovirus) — цитомегаловирус; Ig — иммуноглобулин; УА/мл — «универсальная рабочая единица» содержания антител; VSV (vesicular stomatitis virus) — вирус везикулярного стоматита.

начальным накоплением в крови специфических антител IgM-изотипа?

2. Какова роль доминирующих в начале заболевания антител IgM-изотипа в сыворотках больных при постановке данного теста, основанного на выявлении IgG-антител малой avidности?

3. Почему доля сывороток, в которых выявлены антитела IgG малой avidности, зависит от содержания IgM-антител (при высоком содержании IgM-антител доля пациентов, сыворотка которых содержит малоавидные IgG антитела, увеличивается от 2% до 80% [8])?

4. Почему в сыворотках, содержащих высокие концентрации специфических антител и не разведенных перед тестированием до эмпирически подобранного уровня, регистрируется «ложно низкая avidность IgG-антител»? Если же сыворотки перед тестированием разводят, то выявляемые IgG-антитела проявляют себя как высоко avidные [9]. Это означает, что якобы малая avidность IgG-антител в первом случае определялась не свойствами самих данных антител, а чем-то иным.

Следует подчеркнуть, что интерпретация полученных при ИФА результатов базируется на том, что кинетика реакций антиген—антитело на твердой фазе равнозначна таковой в растворе и характеризуется установлением подвижного равновесия. Однако становится все более очевидным, что это не так.

Ранее нами было показано, что связывание смесей меченых и немеченых моноАТ одинаковой специфичности с антигеном, иммобилизованным на поверхности планшета, характеризуется теми же количественными закономерностями, что и физико-химическая адсорбция смесей веществ, обладающих одинаковым сродством к адсорбенту [10—12]. Нами ранее было установлено, что использование смесей однородных по специфичности ксеногенных (сыворотка иммуного человека и лошади) поликлональных антител дает возможность количественно охарактеризовать процесс специфического связывания каждого компонента с антигеном [11, 12]. Показано, что адсорбция смеси компонентов, обладающих одинаковым сродством к адсорбенту, происходит в соответствии с их суммарной концентрацией, а распределение на поверхности соответствует их парциальному соотношению. Таким образом, с помощью специфических конъюгатов антител можно одновременно в разных планшетах выявлять антитела лошади и антитела человека, используя для этого, как уже говорилось, один и тот же образец.

Выявленные нами закономерности позволяют по-новому рассмотреть и оценить имеющиеся в литературе данные об использовании иммуноферментного анализа для исследования изменения avidности выявляемых в сыворотках специфических IgG-антител. В большинстве анализируемых работ по определению avidности вообще не рассматривается вопрос о соотношении концентраций специфических антител IgG- и IgM-изотипа в анализируемых сыворотках. Между тем, известно, что это соотношение меняется в ходе рассматриваемых вирусных заболеваний: начальное доминирование вирусспецифических антител IgM сменяется доминированием антител изотипа IgG. Было найдено, что ранние IgG-антитела мало avidны, а поздние — высоко avidны [1—6]. Представлялось целесообразным рассмотреть, как может повлиять на результат определения avidности IgG-антител методом твердофазного ИФА изменение соотношения компонентов IgG и IgM в анализируемых сыворотках.

В связи с этим цель данной работы состояла в том, чтобы проанализировать имеющиеся в литературе результаты определения avidности IgG-антител в сыворотках больных с позиций выявленных нами ранее количественных закономерностей специфического связывания смесей поликлональных ксеногенных (человека и лошади) сывороточных антител, а также смесей моноклональных (меченых и немеченых) антител одинаковой специфичности на полиэпитопном антигене в твердофазном ИФА. Задача анализа состояла в оценке достоверности этих данных в свете выявленных закономерностей; такой анализ необходим, поскольку низкая avidность IgG-антител интерпретируется как свидетельство ранней стадии заболевания.

В основе широко используемого в настоящее время метода определения avidности IgG-антител с помощью ИФА лежит представление о том, что малоавидные антитела образуют в лунке планшета непрочные связи со специфическим антигеном, которые легко разрушаются под воздействием хаотропных агентов — 8 М мочевины или 35 мМ диэтиламина, а высокоавидные IgG антитела остаются связанными с антигеном.

Протокол определения таков: в два ряда лунок планшета, сенсibilизированных вирусным антигеном, вносят анализируемую сыворотку (как правило, в одном, лишь иногда — в серии разведений) для специфической адсорбции антител. После адсорбции один ряд лунок промывают 8 М мочевиной (опыт), а другой (контроль) — буфером без мочевины. По разнице в опытных и конт-

рольных показателях ОП в ИФА рассчитывают индекс avidности (ИА).

$$ИА = (ОП_{опыт} / ОП_{контроль}) \cdot 100\%.$$

Принято считать, что если в сравнении с контрольной пробой индекс avidности IgG-антител меньше или равен 30%, то речь идет о начале заболевания, при котором большая часть IgG-антител представлена малоавидными антителами. Если выявляемое количество IgG в анализируемой пробе составляет 50% и более в сравнении с контролем, то этот факт расценивают как свидетельство «созревания avidности» IgG-антител и перехода заболевания в более позднюю фазу.

Установлено, что хаотропные агенты разрушают молекулы антител IgM-, IgA-, IgG3-изотипов, оставляя нетронутыми молекулы антител IgG-изотипа [13]. Известно, что такое избирательное действие хаотропных агентов связано со структурными отличиями антител. Установлено, что денатурация белков мочевиной происходит вследствие разрушения внутримолекулярных водородных связей [14].

Данный тест ориентирован на выявление IgG-антител. При этом специфические IgM-антитела, присутствующие в сыворотке, не принимаются в расчет. Между тем, стало очевидно, что именно IgM-антитела в данном тесте играют ключевую роль.

Thomas и соавт. [15] исследовали avidность специфических IgM-антител к вирусу краснухи в сыворотках больных при первичной инфекции. Схема опытов была такова: в лунки планшета внесли кроличьи антитела к IgM человека. После их адсорбции и промывания в три ряда лунок (А, В, С) вносили анализируемую сыворотку человека (в серии разведений). Затем после специфического связывания IgM-антител из анализируемых сывороток человека с кроличьими антителами в лунках планшета и после промывания лунок в них вносили антиген вируса краснухи. После связывания специфического вирусного антигена IgM-антителами каждый ряд лунок (А, В, С) промывали разной средой: А — ФСБ; В — ФСБ + 8 М мочевины, С — ФСБ + 35 мМ диэтиламин. Далее во всех рядах лунок связавшийся антиген вируса краснухи выявляли с помощью пероксидазного конъюгата мышинных антител к данному вирусу.

Было установлено, что в сыворотках с высокой концентрацией IgM-антител индекс avidности этих антител к вирусу краснухи после обработки мочевиной или диэтиламином был менее 50%. Не было выявлено «созревания avidности» IgM-антител и через 6 нед. Таким образом, полученные

данные были интерпретированы так, что IgM-антитела обладают малой avidностью в течение всего иммунного ответа. Иными словами, под avidностью авторы подразумевают устойчивость к действию мочевины самой молекулы, а не способность паратопов молекул связываться с антигеном. Авторы показали, что данные антитела разрушаются под действием мочевины и смываются при промывании лунок, т.е. речь идет о структурных свойствах молекул антител, а не о паратопах, обеспечивающих их связь с антигеном. Из этих результатов можно также заключить, что IgM-антитела — главные компоненты в смесях с IgG, разрушающиеся под воздействием мочевины или диэтиламина.

Сходные наблюдения описаны и другими авторами [13, 14].

Однако, поскольку в указанных работах при тестировании в ИФА на поверхности сенсibilизированного антигеном планшета специфически связываются оба вида сывороточных антител (IgM и IgG), для анализа процесса необходимо знать их количественное соотношение в исследуемых пробах в динамике иммунного ответа (которое не остается неизменным). По нашим данным, процесс взаимодействия специфических антител с антигеном на твердой фазе происходит в соответствии с суммарной концентрацией компонентов, а распределение на поверхности соответствует их парциальному соотношению [11, 12]. В используемых тестах по определению avidности это обстоятельство, как правило, не учитывается.

Найденные нами закономерности и расчетные коэффициенты связывания АТ на поверхности планшета (условно взятые относительные коэффициенты различий в скорости связывания при различных концентрациях) были использованы для построения модели, отражающей взаимодействие смесей двух видов антител с антигеном на поверхности лунок. Дано и теоретическое обоснование модели [11, 12].

При создании математической модели исходили из следующего:

1. АТ в смесях имеют одинаковое сродство к Аг, и концентрации АТ выражаются в одних и тех же единицах.
2. Скорость взаимодействия с Аг каждого компонента смеси АТ определяется суммарной концентрацией всех АТ.
3. Доля АТ каждого вида, связавшихся с Аг, соответствует его парциальной концентрации в исходной смеси.
4. Существует предел насыщения антителами антигена, связанного с поверхностью лунок; его

Суммарное содержание компонентов в составе адсорбатов К1 и К2 и их парциальное распределение, % от соответствующего контроля [11]
Total content of components of K1 and K2 adsorbates and their partial distribution, % of corresponding control [11]

Компонент Component	Кратность разбавления Dilution multiplicity						
	1	2	4	8	16	32	64
Сумма АТ, ИА/мл Sum of antibodies, ИА/ml	1,0	1,0	1,0	0,56	0,25	0,11	0,047
К1	20	44	100	128	135	176	198
К2	80	80	80	100	100	100	100

Примечание: К1 — минорный компонент, К2 — доминирующий компонент; сумма АТ — суммарное содержание антител в адсорбате. Жирным шрифтом показано, как меняется доля минорного компонента, выявляемого при серийном разведении смеси АТ.

Footnote: K1, minor component; K2, dominant component; Sum of AB, total content of antibodies in adsorbate. Bold typed figures show how the percentage of minor component detected in dilution series of AB mixture changes.

величина обусловлена рядом факторов (ограничение площади связывания, стерические препятствия). В этом случае в зоне плато при титровании АТ в ИФА независимо от концентрации АТ регистрируются одни и те же показатели ОП, т.е. антиген на поверхности связывает одно и то же количество АТ, а избыток несвязавшихся АТ удаляется.

5. При титровании в ИФА линейная зависимость ОП от содержания АТ выявляется в небольшом диапазоне концентраций АТ. При их значениях, превышающих определяемый максимум, уменьшение связывания АТ вызвано ограничением размера поверхности и стерическими препятствиями. При низких концентрациях АТ снижение ОП связано с уменьшением скорости связывания с Аг.

6. При создании модели для каждого соотношения концентраций компонентов смеси АТ рассчитывалась вероятность их совместного попадания в лунку планшета.

Предложенная модель процесса специфического связывания АТ из смесей двух компонентов иллюстрируется следующими данными (табл. 1, [11]). Для рассматриваемого случая при определении avidности смесей антител одинаковой специфичности, но разного изотипа (IgM и IgG) особый интерес представляют расчетные данные о том, как меняется доля выявляемых антител (процент-

ное содержание в сыворотке) при их двукратном разбавлении и **относительном** увеличении свободной поверхности лунки. (Относительное увеличение поверхности при серии разведений тестируемых антител происходит из-за того, что при сохранении той же сорбционной поверхности лунок двукратно уменьшается концентрация тестируемых смесей.)

Для наглядности в табл. 1 данные о выявлении минорного компонента смеси в серии двукратных разведений выделены жирным шрифтом. В этом случае концентрации обоих компонентов в смесях убывают с двукратным шагом, причем исходные концентрации компонентов в смеси различаются лишь в 4 раза. Если из неразведенной смеси адсорбировалось лишь 20% минорного компонента (доминирующий компонент вытесняет его), то по мере разбавления (в серии двукратных разведений) его адсорбция возрастает в 2, 5 и более раз (до 198%) за счет более высокой суммарной концентрации обоих компонентов (в сравнении с контролем) и относительного увеличения свободных мест связывания на поверхности сорбента (в лунке) при разведении смесей.

Адекватность данной модели была подтверждена в серии экспериментов [11, 12]. Так, использование смесей ксеногенных антител (противо-

дифтерийные антитоксические антитела человека и лошади) с различным соотношением концентраций, их последующее серийное разведение и тестирование в ИФА позволило определить взаимное влияние компонентов на их связывание с Аг на поверхности планшета. В табл. 2 представлены результаты одного из таких опытов [11]. АТ человека смешивали с АТ лошади (ПДС) так, что содержание сыворотки человека в смесях было одинаковым (разведение 1:50), а содержание антител лошади варьировало в пределах от 1,0 МЕ/мл до 0,062 МЕ/мл с двукратным шагом. Смеси и соответствующие им контрольные образцы идентично и одновременно вносили в два Аг-сенсibilизированных планшета. После адсорбции с помощью соответствующих пероксидазных конъюгатов антител в одном из планшетов выявляли связавшиеся с антигеном антитела человека, в другом — антитела лошади. Видно, что высокие дозы ПДС (1 МЕ/мл) в начальных разведениях смесей доминируют и вытесняют АТ человека в адсорбате (их выявляемая доля в сравнении с контролем заметно ниже: 54,8%; 59,0; 80,0%)

В серии последующих разведений доля выявляемых антител человека повышается и даже становится больше, чем в контроле (за счет относительного увеличения свободной поверхности лунок планшета и более высокой (в сравнении с контролем) суммарной концентрации компонентов). При меньшем содержании ПДС этот эффект уменьшается и зависит от соотношения концентраций компонентов в исходных смесях (см. табл. 2). В целом картина соответствует представленной выше модели (см. табл.1) и данной ей интерпретации.

В рассматриваемом опыте малое содержание антител человека в адсорбатах при начальных разведениях смеси означает, что остальную площадь заняли доминирующие антитела ПДС. Естественно, что оба вида антител взаимодействовали с антигеном на поверхности лунок совместно, не изолированно друг от друга. Поскольку в модели рассчитывались соотношения двух (любых специфически связывающихся с антигеном) компонентов смеси, можно полагать, что она применима и для смесей антител одинаковой специфичности, но разного изотипа (IgG и IgM).

В тесте определения avidности IgG-антител в сыворотках в качестве доминирующих выступают IgM-антитела. Поскольку в рассматриваемых тестах они преобладают в серии разведений, вероятность того, что каждая молекула IgM-изотипа (пентамер) взаимодействует с антигеном изолированно от IgG-антител, крайне мала. Специфически адсорбированные антигеном антитела IgG ока-

зываются тесно связанными с окружающими их IgM-антителами. Возможно и перекрестное связывание паратопов антител обоих изотипов с антигеном. В связи с этим представляется более обоснованной следующая трактовка событий: удаление связавшихся с антигеном молекул IgM-антител в результате действия хаотропного агента нарушает монослой связавшихся с антигеном молекул обоих изотипов, поэтому количество остающихся в монослое IgG-антител оказывается меньше, чем в контроле. Действительно, показано, что чем выше доля IgM-антител в смеси, тем больше нарушается монослой адсорбированных молекул и большая доля молекул IgG-изотипа смывается вместе с молекулами IgM-изотипа [8].

В тех пробах, в которых не было существенного преобладания IgM-антител при дальнейшем разведении смеси или при начальном равенстве концентраций компонентов в смесях, этот эффект не наблюдался [9].

Здесь уместно привести данные Dollard и соавт. [8], показавших, что среди обследованных пациентов доля сывороток с низкой avidностью специфических антител IgG-изотипа возрастает в зависимости от увеличения содержания в сыворотках антител IgM-изотипа. Авторы измеряли содержание IgM-антител с помощью анализатора Vidas (bioMérieux). Этот инструмент, сочетающий возможности ИФА и анализа флуоресцентной метки, позволяет полуколичественно определять «универсальные рабочие единицы» (УА/мл) содержания антител, соответствующие показателям ОП в ИФА в серии разведений сыворотки. В табл. 3 представлены результаты выявления сывороток с низкой avidностью IgG-антител в зависимости от концентрации в сыворотках IgM-антител к цитомегаловирусу. Видно, что при возрастании в сыворотках содержания IgM-антител наблюдается соответствующее увеличение доли выявленных сывороток с низкой avidностью IgG-антител. Чем выше концентрация выявляемых антител IgM-изотипа в сыворотке, тем больше доля анализируемых сывороток, содержащих малоавидные IgG-антитела. С позиций предложенной нами модели, чем выше концентрация в сыворотке IgM-антител, тем больше нарушается монослой перекрестно связанных с антигеном молекул обоих изотипов при обработке хаотропным агентом.

С этих же позиций может быть рассмотрена еще одна работа по определению avidности IgG-антител к CMV [9]. Авторы пользовались таким же анализатором, что и в работе [8], и нашли, что при исследовании сывороток от больных, содержащих высокие концентрации IgG-антител, в

Выявление антител человека (I) и АТ лошади (II) из смесей по оптической плотности в ИФА [11]**Detection of human (I) and horse (II) antibodies in mixtures on the basis of their optical density in ELISA [11]**

Вид АТ Antibody	Разведение сыворотки человека Human serum dilution	Активность АТ лошади, МЕ/мл Activity of horse AT, U/mL	Кратность разбавления смесей Multiplicity of mixture dilution					
			1	2	4	8	16	32
I	1:50	1,0	1,14 (54,8)	0,87 (59,0)	0,62 (80,0)	0,50 (115,0)	0,30 (158,0)	0,19 (190,0)
		0,5	2,16 (104,0)	1,80 (122,0)	1,14 (146,0)	0,55 (128,0)	0,1 (53,0)	0,07 (70,0)
		0,125	2,32 (111,0)	1,98 (134,7)	0,84 (107,9)	0,32 (74,4)	0,14 (73,7)	0,06 (60,0)
		0,062	2,13 (102,0)	1,79 (121,0)	0,80 (103,0)	0,38 (88,0)	0,18 (94,0)	0,1 (100)
II	1:50	1,0	2,37 (100,0)	2,25 (98,0)	2,37 (107,0)	2,20 (100,0)	2,25 (102,0)	2,22 (103,0)
		0,5	2,34 (104,0)	2,30 (106,0)	2,30 (100,0)	2,31 (106,0)	2,28 (106,0)	2,13 (100,0)
		0,125	2,32 (105,0)	2,30 (105,0)	2,27 (105,0)	1,84 (96,0)	1,37 (84,0)	0,76 (84,0)
		0,062	2,14 (98,0)	2,06 (96,0)	1,89 (98,0)	1,32 (81,0)	0,72 (80,0)	Не определяли Not determined

Примечание: даны показатели ОП, в скобках — % от показателей ОП в контроле.

Footnote: OD values are represented; figures in parentheses are the percentage of OD in control.

тесте регистрируется «ложная малая авидность» этих антител, если сыворотку перед тестированием не разводят до определенного эмпирически подобранного уровня. Если же тестируют достаточно разведенную сыворотку, то определяемые IgG-антитела ведут себя как высокоавидные. Это означает, что кажущаяся малая авидность антител IgG в первом случае определялась не свойствами молекул, а чем-то иным. С нашей точки зрения, единственное, что могло повлиять на этот процесс — это присутствие IgM-антител, разрушающихся под действием мочевины. Как только перед тестированием сыворотку разводили, сум-

марное содержание АТ и концентрация АТ IgM-изотипа в тестируемой пробе уменьшались, в связи с чем снижалась и вероятность совместной IgM-IgG-адсорбции антигеном в серии разведений. Поэтому, разрушаясь под действием хаотропного агента, IgM-антитела оказывали все меньшее дестабилизирующее действие на молекулы IgG-антител.

В рассматриваемых работах подтверждены известные данные о способности мочевины и диэтиламина разрушать водородные связи в молекулах иммуноглобулинов IgM-, IgA- и IgG3-изотипов, имеющих структурные отличия от молекул

Взаимосвязь между уровнем IgM-антител к CMV и долей выявленных сывороток с низкой авидностью IgG [8]**Interrelation between IgM antibody level and percentage of identified sera with low IgG avidity [8]**

Содержание IgM-антител, ИА/мл IgM antibody content, UA/mL	Число сывороток с данным уровнем IgM-антител Number of sera with the given IgM antibody level	Доля сывороток с низкой авидностью IgG, % Sera with low IgG avidity, %
Негативные или эквивалентные по содержанию (< 0,90 ИА/мл) Negative or equivalent in content (< 0,90 UA/mL)	154	1,9
0,9—1,09	50	6,0
1,10—1,29	26	15,4
1,30—1,49	29	17,2
1,50—1,99	32	40,6
>2,00—4,00	33	78,8

IgG. Именно структурные отличия молекул, наличие или отсутствие в них водородных связей, а не различия паратопов, обеспечивающих связывание с антигеном, обуславливают чувствительность антител к хаотропным агентам. Установлено, что в динамике иммунного ответа чувствительность специфических антител IgM изотипа к действию хаотропных агентов не меняется. Нельзя согласиться с авторами [9] в том, что соответствующий тест выявляет низкий уровень авидности IgM-антител. Антитела IgM-изотипа наряду с молекулами IgG-антител взаимодействуют с антигеном на твердой фазе и в адекватных физиологических условиях образуют стабильные связи, конкурируя с IgG-антителами за места связывания, т.е. их паратопы не уступают паратомам IgG-антител. Вместе с тем, показано, что именно IgM-, а не IgG-антитела в динамике иммунного ответа разрушаются при воздействии хаотропных агентов. С нашей точки зрения, при значительном доминировании молекул IgM-антител в смесях с IgG-антителами в тесте по определению авидности фактически определяется не авидность паратопов, обеспечивающих связь с антигеном, а структурные различия между IgG и IgM (наличие водородных связей в молекулах IgM и их отсутствии в молекулах

IgG), а также их относительное содержание в анализируемых смесях.

Рассмотренные данные свидетельствуют в пользу выявленных нами закономерностей адсорбции компонентов в смесях антител. Вместе с тем, данные о том, что мочевиная разрушает адсорбированные антигеном молекулы IgM-антител и, следовательно, частично и опосредованно может влиять на десорбцию IgG-антител, позволяют предположить, в чем состоят различия адсорбционных взаимодействий молекул и взаимодействий при подвижном химическом равновесии. В последнем случае с антигеном на поверхности планшета взаимодействуют антитела одинаковой специфичности, но разного изотипа (IgM с десятью паратопами и IgG — с двумя). При определенных больших концентрациях они могут связываться с антигеном перекрестно. Множественные связи с антигеном молекул антител разной эпитопной специфичности препятствуют диссоциации, именно это обеспечивает стабильную связь комплексов антиген—антитело. Типичный пример — всем известное видимое невооруженным глазом взаимодействие молекул дифтерийного токсина и соответствующих антител. С нашей точки зрения, адсорбционные взаимодействия молекул отличает

наличие в них эпитопов (и, соответственно, паратопов) разной специфичности. Поэтому процессы ассоциации и диссоциации, в отличие от случая подвижного равновесия, не происходят одновременно.

Так что же такое авидность?

Под авидностью молекул антител в настоящее время подразумевают их способность образовывать прочные связи с антигеном. Когда речь идет о сывороточных антителах, возникающих в динамике иммунного ответа на антиген, который, как правило, содержит множество эпитопов разной специфичности, в свете современных исследований становится очевидным, что в крови генерируется поликлональная сыворотка, содержащая сумму моноклональных антител разного изотипа и различной эпитопной специфичности. Этот факт даже в современных работах часто не учитывается.

Ранее [11, 12] нами было показано, что связывание моноклональных антител с полиэпитопным антигеном более эффективно в присутствии специфической поликлональной сыворотки, чем без нее. В этом случае процесс специфического связывания идет в соответствии с суммарной концентрацией антител разной эпитопной специфичности. Поскольку антитела к разным эпитопам антигена могут появляться в ходе иммунного ответа в разное время, суммарное их содержание (концентрация в сыворотке) в процессе ответа возрастает. В связи с этим, видимо, справедливо выражение о том, что в ходе иммунного ответа речь идет не о созревании антител в сыворотке как приобретении ими какого-то особого свойства, а об увеличении суммарного содержания (концентрации) в сыворотке антител разной эпитопной специфичности и изотипа. Таким образом, проведенный анализ работ по определению авидности сывороточных антител показал, что **авидность, как она определяется рассматриваемыми методами, — это условная характеристика, зависящая от соотношения концентраций IgG- и IgM-антител в анализируемых сыворотках.**

Что такое авидность антител?

Авторы статьи в книге [16] пишут: «... существенная информация о реакции антиген—антитело заключена в одной единственной величине — авидности». Далее они рассматривают теоретические вопросы, связанные с количественной характеристикой взаимодействия антигена и антител. Исходная позиция такова: «в отличие от большинства ферментов и многих гормонов антитела, связываясь с лигандом (антигеном), не претерпевают необратимых изменений. Поэтому ре-

акция антиген—антитело, по крайней мере, в принципе всегда обратима». И далее: «в реакции взаимодействия антиген—антитело лежат те же законы термодинамики, что и в основе любой обратимой бимолекулярной реакции связывания». В связи с этим «авидность — это сила связывания, степень сродства с антигеном, характеризующаяся константой ассоциации, которая характеризует обратимую реакцию... Авидность — термодинамическое выражение прочности связи структур, взаимодействующих на основе стереохимической комплементарности. Выражается константой ассоциации».

Сразу следует заметить, что по отношению к сывороточным антителам, образующимся в ходе иммунного ответа на антиген, содержащий множество эпитопов разной специфичности, такой подход едва ли оправдан. В этом случае, как уже говорилось выше, речь идет о поликлональной сыворотке, содержащей сумму моноклональных антител разных изотипов и разной эпитопной специфичности. В последние годы появилось много экспериментальных данных, которые позволяют по-новому оценить характер взаимодействия антигенов и антител. Понятие об авидности связывания антител, с нашей точки зрения, применимо лишь к однородной их совокупности, а именно, к моноклональным антителам. С этих позиций интересно проанализировать ряд работ.

Roost и соавт. [17] оценили концепцию о созревании авидности антител в ходе иммунного ответа к вирусу везикулярного стоматита (VSV). Было установлено, что наивные безмикробные мыши генерируют Т-независимый ответ (IgM-антитела) на 3-й—4-й день. «Сдвиг изотипа» наблюдают на 6-й—8-й день. Это строго соответствует первичному ответу, поскольку праймированные VSV мыши генерировали повышенный синтез IgG-антител уже к 2-му—4-му дню. Высокий титр нейтрализующих антител обнаруживали на 9—12-й день после первичной иммунизации; он оставался стабильно высоким в течение более чем 6 мес. Авторы получили моноАТ к VSV, используя для гибридизации лимфоциты, взятые у мышей в разные сроки после их иммунизации. Полученные и в ранние, и в поздние сроки моноАТ имели IgG-изотип и взаимодействовали с антигеном с высокой авидностью. Не было отмечено каких-либо доказательств дозовой или временной зависимости авидности, т.е. полученные данные противоречили принятой концепции «созревания авидности» антител в ходе иммунного ответа. Комментируя эти результаты, Foote и Eisen [18] пишут, что основной принцип иммунологии, соглас-

но которому в ходе иммунного ответа происходит созревание антител и увеличение их аффинности, может быть подвергнут сомнению. Пытаясь примирить каноническую точку зрения с новыми фактами из работы [17], авторы считают, что нужно сделать выбор из двух возможностей: или «созревание аффинности» не происходит, или оно происходит, но его невозможно определить.

Как известно, рассчитывая константы аффинности, авторы полагают, что процесс взаимодействия антигена и антител завершается установлением подвижного равновесия. В последние годы развиты методы, позволяющие оценивать взаимодействие компонентов, один из которых иммобилизован на поверхности твердой фазы (твердофазный ИФА). Интерпретация получаемых результатов этих исследований, как уже говорилось, базируется на том, что кинетика реакций антиген—антитело на твердой фазе эквивалентна их взаимодействию в растворе и характеризуется установлением подвижного равновесия. Однако становится все более очевидным, что это не так.

Здесь уместно привести работу Nygren и соавт. [19]. Авторы исследовали процесс связывания моноАТ (к DNP) с антигеном, иммобилизованным на поверхности носителя. Количество связавшихся антител определяли методом эллипсометрии с высокой точностью и чувствительностью. Связавшиеся с антигеном антитела не освобождались из комплекса при промывании солевым раствором, но некоторая диссоциация наблюдалась в присутствии в растворе антигена (0,1 мМ). При этом связывание моноАТ внезапно замедлялось при увеличении их концентрации до 1—1,5 пмоль/см² и далее оставалось постоянным. Как пишут авторы, в данном случае нельзя говорить о достижении динамического равновесия, поскольку в отсутствие антигена в растворе (над осадком) они не могли обнаружить какую-либо диссоциацию антител из комплекса с антигеном. То, что в присутствии антигена все же имеет место некоторая диссоциация, авторы объясняют двумя причинами: 1) имеется локальное равновесие между ассоциацией и диссоциацией молекул; 2) по аналогии с другими белками АТ сами по себе не диссоциируют в буфер, но в присутствии антигена могут вести себя, как при обменной реакции между белками.

Описанные результаты соответствуют и нашим наблюдениям. В работе [20], посвященной изучению формирования иммунных комплексов (Аг-АТ), показано, что и в жидкой фазе образовавшиеся комплексы Аг-АТ не диссоциируют при многократном разбавлении смеси. Далее, нами бы-

ло установлено, что взаимодействие антител с антигеном на твердой фазе происходит в соответствии с закономерностями адсорбции и, пользуясь ими, можно адекватно количественно оценить этот процесс [10, 12].

В последние годы появилось много экспериментальных данных, которые позволяют по-новому оценить характер взаимодействия антигенов и антител.

Нами было установлено [11, 12], что связывание моноклональных антител с полиэпитопным антигеном более эффективно в присутствии специфической поликлональной сыворотки, чем в ее отсутствие. В этом случае процесс специфического связывания идет в соответствии с суммарной концентрацией антител разной эпитопной специфичности. Поскольку антитела к разным эпитопам антигена могут появляться в ходе иммунного ответа в разное время, суммарное их содержание в процессе ответа возрастает. В этом смысле, видимо, справедливо выражение о том, что в ходе иммунного ответа идет «созревание avidности», если оно связано с увеличением суммарной концентрации антител разной эпитопной специфичности, содержащихся в сыворотке. Понятие об аффинности связывания антител, с нашей точки зрения, применимо лишь к однородной их совокупности — моноклональным антителам.

Относительно употребления термина **аффинность** применительно к сывороточным антителам можно согласиться с мнением J. Foote и соавт. [18]. Эти исследователи считают, что основной принцип иммунологии о созревании антител в ходе иммунного ответа может быть подвергнут сомнению. В процессе иммунного ответа происходит не созревание, а нарастание синтеза антител разного изотипа и разной специфичности к эпитопам антигена. Это нарастание характеризуется увеличением суммарной концентрации антител в сыворотке и определяет их эффективность.

Таким образом, нами проанализированы работы по определению в ИФА avidности антител в сыворотках с учетом ранее выявленных нами закономерностей специфического связывания антигеном компонентов из смесей антител IgG- и IgM-изотипа [11, 12]. Анализ позволил прийти к выводу, что специфическое связывание обоих изотипов АТ антигеном в ИФА происходит в соответствии с их суммарной концентрацией, а распределение на поверхности сорбента соответствует их парциальному содержанию, т.е. подтвердил основное положение выдвинутой нами ранее модели о том, что взаимодействие АТ-Аг на твердой фазе протекает по типу адсорбционного [11, 12]. С этой

точки зрения при значительных различиях в содержании специфических молекул IgM- и IgG-изотипа в тестируемой сыворотке в начале заболевания разрушение хаотропным агентом IgM-антител, доминирующих в адсорбате, не может не затрагивать и молекулы IgG, связавшиеся с антигеном совместно с молекулами IgM. Поэтому в сравнении с контролем (в отсутствие воздействия хаотропным агентом), количество оставшихся молекул IgG в опытных пробах становится меньше. Это предположение подтверждается и тем, что при дополнительном разведении анализируемых сывороток перед тестированием, т.е. при уменьшении суммарной концентрации [9], этот эффект или уменьшается, или совсем исчезает.

Получено 27.05.16

ЛИТЕРАТУРА

1. Hedman, K. Recent rubella virus infection indicated by low avidity of specific IgG / K. Hedman, I. Seppala // J. Clin. Immunology. — 1988. — V. 8. — P. 214—221.
2. Hedman, K. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella / K. Hedman, S.A. Rousseau // J. Med. Virol. — 1989. — V. 27. — P. 288—292.
3. Blackburn, N.K. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity / N.K. Blackburn, T.G. Besselaar, B.D. Schoub, K.F. O'Connell // J. Med. Virol. — 1991. — V.33 — P. 6—9.
4. Kangro, H.O. Antibody avidity following varicella - zoster virus infections / H.O.Kangro, Sh. Manzoor, D.R.Harper // J. Med. Virol. — 1991. — V. 33 — N 2. — P. 100—105.
5. Mercader, S. Measles virus IgG avidity assay for use in classification of measles vaccine failure in measles elimination settings / S. Mercader, Ph. Garcia, W. Bellini // Clin. Vaccine Immunol. — 2012. — V. 19.— N 11. — P. 1810—1817.
6. Korhonen, M. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity / M. Korhonen, J. Brunstein, H. Haario, A. Katnikov, P. Reskaldani, K. Hedman // Clin. Diagnostic Lab. Immunol. — 1999. — V. 6. — N 5 — P. 725—728.
7. Lumley, S. The combination of specific IgM antibodies and IgG antibodies of low avidity does not always indicate primary infection with cytomegalovirus / S. Lumley, M. Patel, P.D. Griffiths. // J. Med. Virol. — 2014. — V.86. — N 5. — P. 834—836.
8. Dollard, Sh.C. National prevalence estimated for cytomegalovirus IgM and IgG avidity and association between high IgM antibody titer and low IgG activity / Sh.C. Dollard, St.A.S. Staras, M.M. Amin, D.S. Schmid, M.J. Cannon // Clin. Vaccine Immunol. — 2011. — V.18. — N 11. — P. 1895—1899.
9. Dangel, V. Improvement of cytomegalovirus (CMV) avidity testing by adjusting the concentration of CMV — specific IgG in test samples / V. Dangel, U. Bader, G. Enders // J. Clin. Virol. — 2006. — V.35. — N 3. — P. 303—309.
10. Титова Н.Г. Явления адсорбции в серологических реакциях. / Н.Г. Титова, В.В.Свиридов, Е.М. Зайцев, А.Н.Попов // Биотехнология. — 1987. — № 6. — С. 802—808.
Titova, N.G. Phenomenon of adsorption in serological reactions / N.G. Titova, V.V. Sviridov, E.M. Zaitsev, and A.N. Popov // Biotekhnologiya (Biotechnology), 1987. — N 6. — P. 802—808.
11. Титова Н.Г. Иммуноферментный анализ взаимодействия смесей ксеногенных антител одинаковой специфичности с антигеном на твердой фазе / Н.Г. Титова, В.В. Свиридов // Биотехнология. — 2010. — № 6. — С. 75—86.
Titova, N.G. Enzyme immunoassay of interaction of heterologous antibody mixtures of similar specificity with antigen on solid phase / N.G. Titova, and V.V. Sviridov // Biotekhnologiya (Biotechnology). — 2010. — N 6. — P. 75—86.
12. Титова Н.Г. Количественная оценка содержания компонентов в смесях ксеногенных антител к дифтерийному токсину с помощью ИФА / Н.Г. Титова, В.В. Свиридов // Биотехнология. — 2014. — № 5. — С. 76—89.
Titova, N.G. Quantitative assessment by ELISA of components in mixtures of heterologous antibodies to diphtheria toxin / N.G. Titova, and V.V. Sviridov // Biotekhnologiya (Biotechnology). — 2014. — N 5. — P. 76—89.
13. Wilson, K.M. Humoral immune response to primary rubella virus infection/ K.M. Wilson, C. DiCamillo, L. Doughty, E.M. Dax // Clin. Vaccine Immunol. — 2006. — V. 13.- N 3. — P. 380—386.
14. Kamoun, P.P. Denaturation of globular proteins by urea: breakdown or hydrophobic bonds? // Trends Biochem. Sci. — 1988. — V. 13. — N 11. — P. 424—425.
15. Thomas, H.I.J. Slow maturation of IgG avidity and persistence of specific IgM in congenital rubella: implications for diagnosis and immunopathology / H.I.J. Thomas, P. Morgan—Capner, J.E. Cradock—Watson, G. Enders, J.M. Best, S. O'Shea // J. Med. Virol. — 1993. — V. 41. — N 3. — P. 196—200.
16. Берзофски Д.А., Берковер А.Д. Взаимодействие антиген-антитело: Иммунология [Под ред. У. Пола]. — М. : Мир, 1989, Т. 3. — Гл. 3. — С. 5—12.
Berzofsky, D.A., and Berkover, A.D. Antigen-antibody interaction: Immunology [W. Paul, ed.], Moscow: Mir (Translated into Russian), 1989, V. 3. — Chapter 3. — P. 5—12.
17. Roost, H.-P. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity / H.-P. Roost, M.F. Bachmann, A. Haag, U. Kalinke, V. Pliska, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — V. 92. — P. 1257—1261.
18. Foote, J. Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses / J. Foote, H.N. Eisen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — V.92. — P.1254—1256.

19. *Nygren, H.* Kinetics of antibody binding to solid-phase-immobilized antigen. Effect diffusion rate limitation and steric interaction / H. Nygren, M. Werthen, M. Stenberg // *J. Immunol. Methods.* — 1987. — V. 101. — P. 63—71.
20. *Титова Н.Г.* Иммуноферментный анализ иммунных комплексов, сформированных *in vitro* при взаимодействии сывороточных антител с дифтерийным токсином / Н.Г. Титова, В.В. Свиридов // *Приклад. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41. — № 2. — С. 235—242.
Titova, N.G. Enzyme immunoassay of immune complexes formed *in vitro* during the interaction of serum antibodies with diphtheria toxin / N.G. Titova, and V.V. Sviridov // *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya (Applied Biochemistry and Microbiology).* — 2005. — Т. 41. — № 2. — С. 235—242.

N.G. TITOVA

The Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera,
105064, Moscow Russia

e-mail: ng_titova@mail.ru

Regularities of Interaction of Serum Specific Antibodies with Solid Phase-Immobilized Antigens. Avidity and Affinity of Antibodies

The investigations on the assay of IgG antibodies avidity in sera by solid-phase ELISA have been analyzed. The analysis was performed from the point of our previously established regularities in the specific binding in ELISA of antigen to components of mixtures of heterologous antibodies with similar antigen-specificity at varying ratios of their concentrations. The above approach permitted to interpret differently the experimental data. Our analysis showed that the test demonstrates the presence or absence of the predomination of IgM isotype over IgG isotype antibodies rather than the avidity of the latter. The problem of the current understanding of the terms of antibody avidity and affinity is discussed.

Key words: adsorption, affinity, antibodies, avidity, cytomegalovirus (CMV), ELISA.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 4, P. 38—48.