

**ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ АНТИТЕЛ****С. А. Бобровник, Н. Ф. Стародуб**

**Введение.** Реакция связывания антител с антигеном обусловлена взаимной комплементарностью реагирующих структур. В связи с этим даже незначительные изменения третичной или четвертичной структуры антител могут индуцировать уменьшение их сродства к антигену и, как следствие, ослабление или исчезновение реакции взаимодействия. Поэтому, исследуя динамику изменения количества «активных» антител под воздействием какого-либо фактора, можно получить представление об изменении структуры определенной части популяции иммуноглобулинов. В свою очередь определение кинетических параметров этого процесса дает возможность изучить его механизм и термодинамику. Целью настоящей работы явилось исследование кинетических и термодинамических характеристик процесса термоинактивации противостафилококковых антител.

**Материалы и методы.** Корпускулярный антиген стафилококка и препарат противостафилококковых антител готовили, как описано ранее [1].

Для иммобилизации антигена на платах в каждую лунку вносили по 0,15 мл взвеси инактивированного стафилококка ( $5 \cdot 10^{10}$  клеток в 1 мл) в 0,15 М бикарбонате аммония и высушивали при 37 °С. Затем платы тщательно отмывали в проточной воде от несвязавшегося стафилококка, промывали дистиллятом, высушивали и использовали в дальнейшей работе.

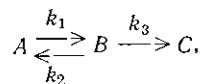
Исследования динамики термоинактивации антител проводили при температурах 66–72 °С (в водяной бане). В нагретый до определенной температуры забуференный 0,85 %-ный раствор NaCl (рН 7,2) вносили антитела (одна часть антител к 20 частям раствора) и через различные интервалы времени отбирали образцы для дальнейших исследований. Концентрацию активных антител в этих образцах определяли с помощью иммуоферментного метода [2], используя конъюгат β-галактозидазы с кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши фирмы «Amersham» (Англия), а также орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид в качестве субстрата для выявления указанного фермента. Реакцию проводили в 96-ячеечных плоскостонных платах, оптическую плотность измеряли при помощи автоматического микрокалориметра фирмы «DuPont» (США) при длине волны 405 нм.

На основании полученных кинетических данных вычисляли энергию активации, свободную энергию, энтропию и энтальпию активации процесса термоденатурации антител, как описано [3].

**Результаты и обсуждение.** На рис. 1 представлены кривые кинетики термоинактивации антител в полупологарифмической системе координат. Как видно из рисунка, через 8–10 мин после начала прогрессивания скорость процесса инактивации антител резко снижалась, а затем на протяжении всего последующего периода наблюдений она оставалась постоянной. Теоретический анализ протекания аналогичных процессов, кинетические кривые которых в полупологарифмической системе координат аппроксимируются двумя прямыми, пересекающимися под определенным углом, проведен ранее [4]. Двухкомпонентность кривых кинетики исследуемого процесса может быть обусловлена тем, что реагирующее вещество состоит из смеси двух типов молекул, константы скорости реакции которых заметно различаются между собой (гетерогенная модель). В противном случае (если вещество является гомогенным) имеет место более сложный процесс, первая стадия которого является обратимой.

Как было показано [4], в случае гетерогенной модели реакции касательные к кинетическим кривым при  $t \gg 0$  пересекаются на оси ординат в одной точке, которая отстоит от начала координат на расстоянии, равном логарифму концентрации медленно реагирующего веще-

ства. Поскольку асимптоты к экспериментальным кривым кинетики термоинактивации антител пересекают ось ординат в различных точках, следовательно, гетерогенная модель является непригодной для описания исследуемого процесса. В этом случае полученные результаты можно объяснить с помощью так называемой последовательной модели реакции, согласно которой исследуемое вещество  $A$  (в данном случае иммуноглобулины) обратимо превращается в промежуточный продукт  $B$ , а затем необратимо в конечный продукт реакции  $C$ :



где  $k_1$ ,  $k_2$  и  $k_3$  — константы скорости реакции.

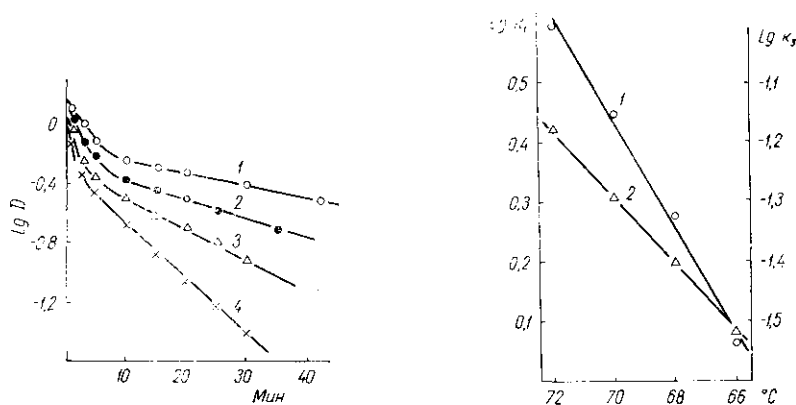


Рис. 1. Динамика термоинактивации антистафилококковых антител при различных температурах: 1—66; 2—68; 3—70; 4—72 °С. По оси ординат — логарифм оптической плотности; по оси абсцисс — время

Fig. 1. The dynamics of antistaphylococcal antibodies thermoinactivation at various temperatures: 1—66; 2—68; 3—70; 4—72 °C. On the ordinate axis — the logarithm of optic density; on the abscissa axis — time

Рис. 2. Зависимость  $\lg k$  от обратной величины абсолютной температуры (график Аррениуса): 1 —  $A \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} B$ ; 2 —  $B \xrightarrow{k_3} C$

Fig. 2. Dependence of  $\lg k$  on the inverse value of absolute temperature (the Arrhenius plot): 1 —  $A \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} B$ ; 2 —  $B \xrightarrow{k_3} C$

В процессе термоинактивации антител первым этапом является, видимо, обратимая денатурация иммуноглобулина, после чего молекула антитела может вернуться в исходное состояние или же денатурировать необратимо. Ранее было показано [4], что расчет констант скорости реакции последовательной модели можно выполнить с помощью следующих выражений:

$$k_1 = x_1 - \alpha (x_1 - x_2); \quad (1)$$

$$k_2 = x_2 + \alpha (x_1 - x_2) - \frac{x_1 x_2}{x_1 - \alpha (x_1 - x_2)}; \quad (2)$$

$$k_3 = \frac{x_1 x_2}{x_1 - \alpha (x_1 - x_2)}. \quad (3)$$

При этом значения  $x_1$ ,  $x_2$  и  $\alpha$  вычисляли из экспериментальных кривых следующим образом:

$$x_1 = \frac{1}{t_1} \ln \frac{[A_0] - \alpha}{[A_1] - \alpha \exp(-x_2 t_1)}; \quad (4)$$

$$x_2 = \frac{1}{t_{n+1} - t_n} \ln \frac{[A_n]}{[A_{n+1}]}; \quad (5)$$

$$\alpha = \exp \frac{t_{n+1} \ln [A_n] - t_n \ln [A_{n+1}]}{t_{n+1} - t_n}, \quad (6)$$

где:  $[A_0]$  — исходная концентрация вещества  $A$ ;  $[A_1]$ ,  $[A_n]$  и  $[A_{n+1}]$  — концентрации вещества  $A$  через промежутки времени  $t_1$ ,  $t_n$  и  $t_{n+1}$ , причем  $t_1$  близко к нулю, а  $t_n$  и  $t_{n+1} \gg t_1$ .

Константы скорости исследуемого процесса, вычисленные из экспериментальных кинетических кривых (рис. 1) при помощи выражений (1) — (6), представлены в табл. 1. На графике Аррениуса (рис. 2)  $k_1$  и  $k_3$  увеличиваются пропорционально повышению температуры, тогда как величина  $k_2$  от температуры не зависит. Отсутствие температурного влияния на значение  $k_2$  свидетельствует об очень низкой энергии активации процесса перехода молекулы антитела из состояния обратимой денатурации в исходное состояние. С повышением температуры величина  $k_1$  увеличивается быстрее, чем  $k_3$ , что указывает на более высокую энергию активации перехода  $A \xrightarrow{k_1} B$  по сравнению с  $B \xrightarrow{k_3} C$ . Расчеты также показывают, что энергия активации процесса  $A \xrightarrow{k_1} B$  примерно в 1,5 раза превышает аналогичный показатель для процесса  $B \xrightarrow{k_3} C$  (табл. 2).

Таблица 1

Константы скорости процесса термоинактивации антител при различных температурах, мин<sup>-1</sup>

Rapid constants of process antibodies thermoinactivation at various temperatures

Константа	Температура, °C			
	66	68	70	72
$k_1$	1,1550	1,9010	2,8150	3,8720
$k_2$	0,0180	0,0190	0,0190	0,0180
$k_3$	0,0296	0,0400	0,0518	0,0659

Таблица 2

Значения термодинамических показателей процесса термоинактивации антител

Thermodynamic values for process thermoinactivation of antibodies

Процесс	Показатель			
	$E_a$ , Дж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta H^*$ , Дж·моль <sup>-1</sup>	$\Delta S^*$ , Дж·моль <sup>-1</sup> × град <sup>-1</sup>	$\Delta G^*$ , Дж·моль <sup>-1</sup>
$A \xrightarrow{k_1} B$	196221	193376	325,4	83017
$B \xrightarrow{k_3} C$	129327	126982	99,1	93354

Для обратимой стадии термоинактивации антител характерна высокая энтропия. Это свидетельствует о том, что на первом этапе инактивации антител разрывается большое число слабых связей. В результате этого молекула антитела обратимо изменяет конформацию и может в дальнейшем возвратиться в исходное состояние или же, приобретая дополнительную энергию активации, равную 129827 Дж × моль<sup>-1</sup>, необратимо денатурировать. Энтропия необратимой стадии сравнительно невелика (99,2 Дж·моль<sup>-1</sup>·град<sup>-1</sup>), что указывает на разрыв меньшего числа связей, чем на первой стадии термоинактивации антител. Вместе с тем эти связи, по-видимому, более прочные, чем связи, разрушаемые на первой стадии, так как энтальпии активации обеих стадий различаются значительно меньше по сравнению с соответствующими энтропиями.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что термоинактивация антител является двухстадийным процессом (причем первая стадия обратимая, а вторая — необратимая), который может быть описан с помощью так называемой последовательной модели.

#### DYNAMICS AND MECHANISM OF THE ANTIBODY THERMOINACTIVATION

*S. A. Bobrovnik, N. F. Starodub*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

It is shown that the kinetic plots of the antibody thermoinactivation in semilogarithmic scale are approximated by two straight lines intersecting at a certain angle. The model of the antibody thermoinactivation process is proposed. Both the kinetic characteristics of the process studied at various temperatures and its thermodynamic parameters are calculated.

1. *Bobrovnik S. A.* Enumeration of specific antibody-forming cells by the immunofluorescent imprint technique // *EOS J. Immunol. and Immunopharmacol.*—1986.—15, N 3.—P. 178—182.
2. *Gripenberg M., Kurki P.* Demonstration of human autoantibodies by quantitative enzyme immunoassays // *J. Immunol. Meth.*—1986.—92, N 2.—P. 145—159.
3. *Makkur T. K. S.* Thermodynamics of hapten-antibody interactions // *CRC Crit. Rev. Biochem.*—1985.—16, N 2.—P. 133—167.
4. *Бобровник С. А.* Определение констант скорости некоторых биэкспоненциальных биологических процессов // *Биополимеры и клетка.*—1987.—3, № 4.—С. 245—250.
5. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты.— М.: Мир, 1966.—816 с.

Ин-т молекуляр. биологии  
и генетики АН УССР, Киев

Получено 02.03.87

УДК 576.311.346.2

#### ИНАКТИВАЦИЯ ЦЕНТРОСОМ В МИТОЗЕ ЛАЗЕРНЫМ МИКРООБЛУЧЕНИЕМ

**И. А. Воробьев, В. А. Драчев, Ю. С. Ченцов**

**Введение.** Для выяснения роли центриолей в митозе в 70-х годах группой исследователей под руководством М. Бернса были предприняты эксперименты по лазерному микрооблучению центросом [1—4]. Результаты этих экспериментов неоднозначны, что может быть связано как с использованием различных лазеров (непрерывные или импульсные, длины волн от 265 до 514 нм), так и с различным поведением клеток, облучаемых на разных стадиях митоза. Главный вывод из работ Бернса с соавт. состоит в том, что облучение центросомы в профазе, приводящее к разрушению или повреждению перичентриолярного материала, влечет за собой остановку митоза в промета- или в метафазе с последующим аномальным цитокинезом. Невыясненным остается вопрос о судьбе клеток, чьи центросомы перестают функционировать позднее — в прометафазе и метафазе.

В настоящее время роль центросомы как центра организации микротрубочек может считаться доказанной [5], причем известно, что рост микротрубочек индуцируется перичентриолярным материалом, но не самими центриолями. Таким образом, на сегодня мы не можем ничего