



УДК 577.112:612.115

О. П. Костюченко, І. М. Колеснікова,
член-кореспондент НАН України **Е. В. Луговської,**
академік НАН України **С. В. Комісаренко**

Ефект (феномен) збільшення активності моноклонального антитіла I-1D до D-димеру фібрину людини при нагріванні

Раніше нами була отримана гібридома, яка продукувала моноклональне антитіло I-1D класу IgG1, яке з високою специфічністю реагувало з D-димером фібрину людини, без перехресної реакції з фібриногеном та фібрином. В даній роботі було вперше встановлено, що після прогрівання при 63 °C впродовж 10 хв зв'язування та афінність цього антитіла до антигену значно збільшується. Інше, отримане нами D-димер-специфічне моноклональне антитіло III-3b, не змінювало своїх властивостей після прогрівання і було використане як контрольне. Моноклональне антитіло I-1D у подальшому може бути використане в дослідженнях структурних перебудов в молекулі імуноглобуліна.

Ключові слова: фібриноген, фібрин, D-димер, моноклональні антитіла, тромбоемболія, діагностичні тест-системи.

Серцево-судинні захворювання є основною причиною високої смертності у сучасному світі, в тому числі в Україні. Ці захворювання супроводжуються активацією системи зсідання крові, що часто призводить до тромбоемболії всередині судини. Для клінічної діагностики серцево-судинних захворювань (інфаркту міокарда, ішемічного інсульту головного мозку, ДВЗ-синдрому, тромбозу глибоких вен, тромбоемболії легеневої артерії) необхідне кількісне визначення в плазмі крові людини маркерів активації системи зсідання крові та загрози тромбоемболії — фібриногену, розчинного фібрину і D-димеру.

Для своєчасного виявлення наявності або утворення тромбу в кров'яному руслі істотне значення належить визначенню в плазмі крові одного з основних молекулярних маркерів системи гемостазу — D-димеру [3], який є найбільшим кінцевим продуктом плазмінового розщеплення фібрину, стабілізованого фактором XIIIa. Цей фрагмент включає два D-домен двох молекул фібрину, сполучених між собою ізопептидними зв'язками (A α 105–206, B β 134–461, γ 63–411). У світовій клінічній практиці визначення D-димеру входить в усі алгоритми діагностики тромбозу глибоких вен кінцівок і тромбоемболії легеневої артерії [4, 5].

© О. П. Костюченко, І. М. Колеснікова, Е. В. Луговської, С. В. Комісаренко, 2015

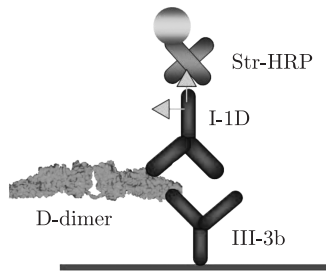


Рис. 1. Схема визначення D-димеру в плазмі крові людини за допомогою бісайтового імуоферментного аналізу (‘сендвіч’-варіанту) з монАТ ІІІ-3b (‘catch’) та монАТ І-1D (‘tag’)

При тромбозі глибоких вен варіант зниження вмісту D-димеру водночас зі значним зростанням вмісту розчинного фібрину в плазмі крові хворих свідчить про активацію системи зсідання крові, порушення балансу між коагуляційною та фібринолітичною ланками гемостазу і є загрозою тромбоутворення. Таким чином, для діагностики загрози тромбоутворення необхідне одночасне визначення вмісту розчинного фібрину та D-димеру на всіх етапах лікування.

Кількісне визначення D-димеру в плазмі крові ґрунтується виключно на імуохімічних методах з використанням моноклональних антитіл (монАТ), специфічних до D-димеру, які не реагують перехресно з фібриногеном і розчинним фібрином [5]. Це можливо тільки за умови, якщо епітопи для цих монАТ у молекулі D-димеру є експонованими, а в молекулах фібриногену та фібрину закритими або відсутніми.

Раніше було отримано моноклональне антитіло ІІІ-3b [2], яке специфічно реагує з D-димером і успішно використовується для його виявлення в плазмі крові людини як ‘catch’-антитіло. Епітоп для цього антитіла знаходиться в N-кінцевій частині β -ланцюга D-димеру (у фрагменті $\beta\beta$ -134–190). Але, оскільки D-димер може утворювати в плазмі крові комплекс з фібрином та іншими продуктами деградації фібрину і фібриногену, що містять D-домени, то як детектуюче ‘tag’-антитіло краще використовувати також специфічне до D-димеру антитіло, але спрямоване до іншого епітопу. Таким монАТ є отримане нами антитіло І-1D [1], яке не конкурує з монАТ ІІІ-3b за місце зв'язування в D-димері фібрину людини.

У наших попередніх роботах була показана можливість використання монАТ І-1D як ‘tag’-антитіла в ‘сендвіч’-варіанті ELISA. Для виявлення в плазмі крові D-димеру, який зв'язався з адсорбованим на мікропланшеті ‘catch’-монАТ ІІІ-3b, використовували монАТ І-1D, мічене біотином [6]. Мітку виявляли при додаванні кон'югата стрептавідину з пероксидазою (‘Amersham Pharmacia Biothec’, Швеція) та субстратного розчину перекису водню з *орто*-фенілендіаміном (рис. 1). Важливо зазначити, що концентрацію D-димеру в цих умовах можна виявляти в діапазоні концентрацій від 10 до 1000 нг/мл при розведенні плазми крові в 10 разів. Цей діапазон концентрацій повністю перекриває діапазон концентрацій D-димеру в нормі та при різних патологіях [7].

Відомо, що імуоглобуліни G (IgG), до яких відносяться монАТ І-1D й ІІІ-3b, є порівняно термостабільними та витримують нагрівання за температури 75 °C до 30 хв. У наукових літературних джерелах є дані про температурні пороги нагрівання IgG1 монАТ у межах 40–80 °C залежно від тривалості часу (10–70 хв) [8]. Також відомо, що молекули IgG агрегують при нагріванні їх розчинів [9].

Відзначимо, що нагрівання розчину IgG при 63 °C впродовж 15 хв є широко поширеним методом отримання розчинних агрегатів IgG [10]. Такі агрегати мають властивості,

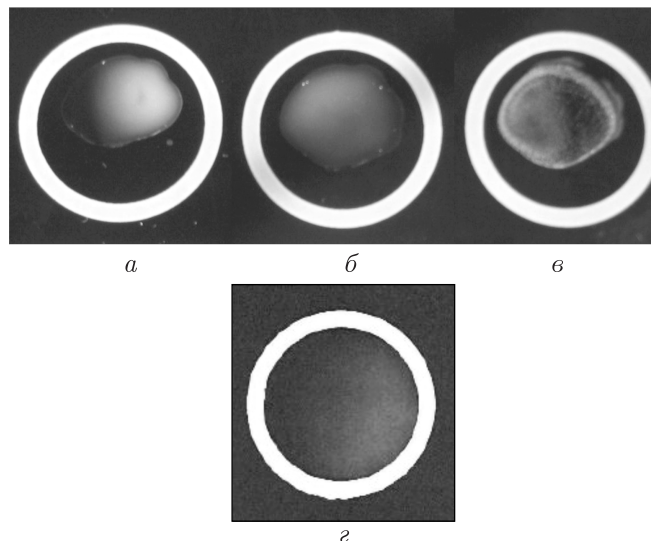


Рис. 2. Аглоутинація частинок латексу: а — з монАТ I-1D, б — з монАТ III-3b, в — з монАТ I-1D + монАТ III-3b в присутності 550 нг/мл D-димеру в плазмі крові людини, г — контроль (донорська плазма)

аналогічні властивостям комплексів антиген-антитіло, а саме: вони фіксують комплемент, зв'язуються з макрофагами та викликають реакції Артуса [11].

В наших експериментальних дослідженнях монАТ I-1D й III-3b були використані для розробки напівкількісного латексного експрес-методу визначення D-димеру в плазмі крові людини. Для цього обидва монАТ, специфічні до D-димеру, прогрівали у забуференому фізіологічному розчині (0,01 моль/л K^+ -фосфатний буфер з 0,14 моль/л NaCl pH 7,4) при температурі 63 °C впродовж 10 хв, після чого монАТ адсорбували на частинках латексу (0,8 мкм, "Sigma-Aldrich", США) або окремо, або разом. Потім до частинок латексу додавали плазму крові людини, що містила 550 нг/мл D-димеру і спостерігали реакцію аглоутинації. Як видно з рис. 2, найкраща аглоутинація (++++) спостерігалась при використанні суміші двох видів монАТ, специфічних до D-димеру.

Дещо несподіваними виявилися результати, які були отримані при прогріванні монАТ I-1D. У цьому випадку нами було виявлено зростання активності монАТ I-1D майже вдвічі за результатами твердофазного імуоферментного аналізу (тІФА). Так, оптична густина при 492 нм після зв'язування антитіла з адсорбованим на планшеті D-димером становила до його прогрівання 1,128, а після — 2,127 (рис. 3, а). Однак при використанні іншого монАТ III-3b, специфічного до D-димеру, подібний ефект не спостерігався (див. 3, б).

З огляду на це, ми спрямували наші зусилля на перевірку отриманих результатів. Так, за допомогою непрямого конкурентного тІФА було визначено константу дисоціації (K_D) цього монАТ у реакції з D-димером, як описано в роботах [12, 13]. Для непрогрітого монАТ вона становила $3,3 \cdot 10^{-9}$ М, а після прогрівання монАТ I-1D реагувало з D-димером з афінністю на порядок більшою ($K_D = 5,0 \cdot 10^{-10}$ М). Також було виявлено, що ефект підвищення активності після прогрівання монАТ I-1D зберігається при міченні його біотином. Проте при прогріванні вже біотинильованого монАТ цей ефект не спостерігається (рис. 4). Такі дані вірогідно пояснюються тим, що модифікація монАТ I-1D N-гідроксисукцинімід біотином призводить до втрати його здатності активуватися при прогріванні. Це дозволяє припустити важливу роль аміногруп молекули монАТ у реалізації ефекту підвищення активності.

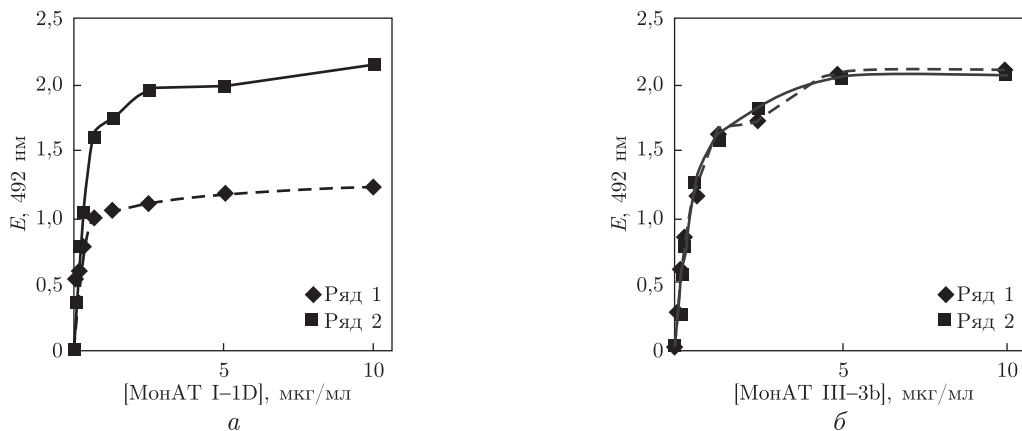


Рис. 3. Вплив прогрівання монАТ I-1D (а) й III-3b (б) на зв'язування їх з антигеном D-димером фібрину людини, імобілізованим на мікропланшеті (ряд 1 — до прогрівання, ряд 2 — після прогрівання)

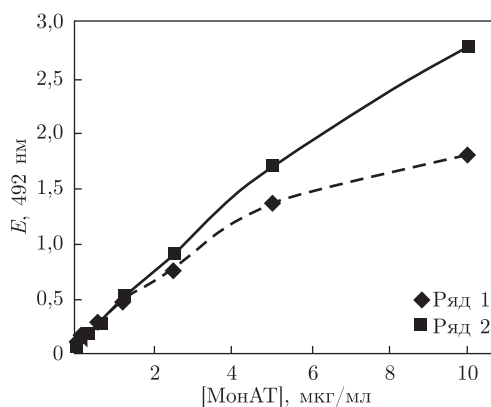


Рис. 4. Вплив прогрівання на зв'язування біотинильованих монАТ I-1D з антигеном D-димером фібрину людини, імобілізованим на мікропланшеті (ряд 1 — біотинильовані монАТ I-1D; ряд 2 — біотинильовані монАТ I-1D після прогрівання)

У результаті наших досліджень показано, що підвищена активність і специфічність прогрітого монАТ I-1D до D-димеру зберігалася протягом тривалого часу при 4 °С (більше року). Це монАТ реагувало лише з D-димером та не зв'язувало інші антигени (фібрин(оген), D-, E₃-фрагменти, БСА).

З метою встановлення закономірностей підвищення активності і специфічності монАТ після прогрівання нами також було перевірено, чи не підвищується активність ряду монАТ іншої специфічності (до різних епітопів молекули фібрин(оген)у) після їх прогрівання при температурі 63 °С впродовж 10 хв. Для цих монАТ даний ефект був відсутнім, як й у випадку з контрольним монАТ III-3b.

Слід зазначити, що в літературних джерелах нами не було знайдено жодних повідомлень про зростання активності монАТ після його прогрівання при високих температурах та збереження підвищеної активності протягом тривалого часу.

На даний час чутливість імуноферментних тест-систем, які виробляються провідними біотехнологічними компаніями, варіює в діапазоні від 0,036 до 0,408 МО/мл. Одним з важливіших факторів, що визначає чутливість “сендвіч”-методу, є концентрація активних антигензв'язуючих сайтів антитіл, адсорбованих на поверхні твердої фази. Так, при

прямий (пасивний) сорбції монАТ на поверхню полістиролових планшетів близько 90–99% антитіл можуть втратити здатність зв'язуватися з антигеном внаслідок денатурації та неправильної орієнтації молекул. Однак пасивне адсорбування залишається дуже поширеним способом імобілізації антитіл через свою простоту та низьку вартість. Тому пошук нових методичних прийомів, які б дозволили максимально зберегти антигензв'язуючу активність імобілізованих монАТ і тим самим збільшити чутливість тест-систем, не втрачає своєї актуальності.

Важливо зазначити, що описаний ефект зростання активності монАТ I-1D після прогрівання при 63 °С впродовж 10 хв може бути використаний в бісайтовому імуоферментному, латексному і імунохроматографічному методах для підвищення чутливості кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини. Поряд з цим, виявлений феномен заслуговує подальшого вивчення з теоретичної точки зору.

Однією із основних задач сучасної структурної біології є дослідження механізму білкового фолдингу, який формує унікальну нативну структуру білка, здатну до виконання біологічних функцій.

Згідно з загальноприйнятою на сьогодні точкою зору на процес білкового фолдингу, конформаційний перехід білка з повністю денатурованого (розгорнутого) в нативний (компактний) стан здійснюється, як правило, послідовно через набір проміжних за ступенем структурної впорядкованості конформацій (інтермедіатів холдингу) [14].

Можна припустити, що D-димер-специфічне монАТ I-1D певно має проміжну конформацію, яка після прогрівання стає завершеною і оптимальною для взаємодії зі своїм антигеном.

Таким чином, нами було отримано і схарактеризовано унікальне монАТ I-1D, яке розпізнає антигенну детермінанту на D-димері фібрину людини та показано ефект (феномен) збільшення активності цього монАТ в реакції антиген–антитіло при нагріванні майже вдвічі. Ми вважаємо, що подальші дослідження температурної залежності функціональних змін, які відбуваються в молекулі монАТ I-1D, з використанням фізичних методів (зокрема, метод диференціальної сканувальної мікрокалориметрії) [15] можуть дати відповідь на характер цих структурних перебудов в молекулі імуноглобуліна і матимуть істотне як фундаментальне, так і прикладне значення.

Цитована література

1. Костюченко О. П., Колеснікова І. М., Литвинова Л. М., Кошель Т. А., Луговська Н. Е., Луговської Е. В., Комісаренко С. В. Моноклональні антитіла, які розпізнають нову антигенну детермінанту на D-димері фібрину людини // Доп. НАН України. – 2011. – № 5. – С. 171–175.
2. Lugovskoy E. V., Kolesnikova I. N., Gritsenko P. G., Zolotareva E. N., Gaffney P., Nieuwenhuizen W., Komisarenko S. V. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin // *Thromb. Res.* – 2002. – **107**. – P. 151–156.
3. Walker J. B., Nesheim M. E. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**. – P. 5201–5212.
4. Папаян Л. П., Князева Е. С. D-димер в клинической практике: Пособие для врачей. – Москва: ООО “Инсайт полиграфика”, 2002. – 20 с.
5. Di Nisio M., Squizzato A., Rutjes A. W. S., Buller H. R., Zwinderman A. H., Bossuyt P. M. M. Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review // *J. Thromb. Haemost.* – 2007. – **5**. – P. 296–304.
6. Harlow E., Lane D. *Antibodies: A laboratory manual.* – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988. – 726 p.

7. *Луговской Э. В., Макагоненко Е. М., Комисаренко С. В.* Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. – Киев: Наук. думка, 2013. – 230 с.
8. *Thakkar S. V., Sahni N., Joshi S. B., Kerwin B. A., He F., Volkin D. B., Middaugh C. R.* Understanding the relevance of local conformational stability and dynamics to the aggregation propensity of an IgG1 and IgG2 monoclonal antibodies // *Protein Sci.* – 2013. – **22**. – P 1295–1305.
9. *Rosenqvist E., Jossang T., Feder J.* Thermal properties of human IgG // *Mol. Immunol.* – 1987. – **24**. – P. 495–501.
10. Пат. РФ № 2008916. – Способ пастеризации водного раствора иммуноглобулина / *Магнин Э. А., Вах П. Ш., Деннис П.* – Заявл. 24.11.1987. – Оpubл. 15.03.1994.
11. *Christian C. L.* Studies of aggregated gamma-globulin // *J. Immunol.* – 1960. – **84**. – P. 112–121.
12. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E.* Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Immunol. Methods.* – 1985. – **77**. – P. 305–319.
13. *Stevens F. J.* Modification of an Elisa-Based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody // *Mol. Immunol.* – 1987. – **24**. – P. 1055–1060.
14. *Rizzuti B., Daggett V.* Using simulations to provide the framework for experimental protein folding studies // *Archiv. Biochem. and Biophys.* – 2013. – **531**. – P. 128–135.
15. *Johnson C. M.* Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability // *Archiv. Biochem. and Biophys.* – 2013. – **531**. – P. 100–109.

References

1. *Kostiuchenko O. P., Kolesnikova I. M., Litvinova L. M., Koshel T. A., Lugovskaya N. E., Lugovskoy E. V., Komisarenko S. V.*, Dopov. NAN Ukraine, 2011, №5: 171–175 (in Ukrainian).
2. *Lugovskoy E. V., Kolesnikova I. N., Gritsenko P. G., Zolotareva E. N., Gaffney P., Nieuwenhuizen W., Komisarenko S. V.*, *Thromb. Res.*, 2002, **107**: 151–156.
3. *Walker J. B., Nesheim M. E.*, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**: 5201–5212.
4. *Papaian L. P., Kniazeva E. C.* D-dimer in clinical practice: Doctor's Manual. Moscow: LLC "Insait poligrafika", 2002 (in Russian).
5. *Di Nisio M., Squizzato A., Rutjes A. W. S., Buller H. R., Zwinderman A. H., Bossuyt P. M. M.*, *J. Thromb. Haemost.*, 2007, **5**: 296–304.
6. *Harlow E., Lane D.* Antibodies: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
7. *Lugovskoi E. V., Makogonenko E. M., Komisarenko S. V.* Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin. Kiev: Nauk. Dumka, 2013 (in Russian).
8. *Thakkar S. V., Sahni N., Joshi S. B., Kerwin B. A., He F., Volkin D. B., Middaugh C. R.*, *Protein Sci.*, 2013, **22**: 1295–1305.
9. *Rosenqvist E., Jossang T., Feder J.*, *Mol. Immunol.*, 1987, **24**: 495–501.
10. Пат. RU N 2008916. Pasteurization of immunoglobulin solutions. Magnin A. A., Wah P. S., Dennis P., Filed 24.11.1987; Pub. 15.03.1994 (in Russian).
11. *Christian C. L.*, *J. Immunol.*, 1960, **84**: 112–121.
12. *Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E.*, *J. Immunol. Methods.*, 1985, **77**: 305–319.
13. *Stevens F. J.*, *Mol. Immunol.*, 1987, **24**: 1055–1060.
14. *Rizzuti B., Daggett V.*, *Archiv. Biochem. and Biophys.*, 2013, **531**: 128–135.
15. *Johnson C. M.*, *Archiv. Biochem. and Biophys.*, 2013, **531**: 100–109.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 29.04.2015

Е. П. Костюченко, И. Н. Колесникова,
член-корреспондент НАН Украины **Э. В. Луговской,**
академик НАН Украины **С. В. Комисаренко**

Эффект (феномен) увеличения активности моноклонального антитела I-1D к D-димеру фибрина человека при нагревании

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

Ранее нами была получена гибридома, которая продуцировала моноклональное антитело I-1D класса IgG1, которое с высокой специфичностью и аффинностью реагировало с D-димером фибрина человека, без перекрестной реакции с фибриногеном и фибрином. В данной работе было впервые установлено, что после прогревания при 63 °C в течение 10 мин связывание и аффинность этого антитела к антигену значительно увеличиваются. Другое, полученное нами D-димер-специфическое моноклональное антитело III-3b, не изменяло своих свойств после прогревания, и было использовано в качестве контроля. Моноклональное антитело I-1D в дальнейшем может быть использовано в исследованиях структурных перестроек в молекуле иммуноглобулина.

Ключевые слова: фибриноген, фибрин, D-димер, моноклональные антитела, тромбообразование, диагностические тест-системы.

O. P. Kostiuchenko, I. M. Kolesnikova,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **E. V. Lugovskoy,**
Academician of the NAS of Ukraine **S. V. Komisarenko**

The effect (phenomenon) of increasing the activity of monoclonal antibody I-1D to human D-dimer after heating

Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

The hybridoma which produces monoclonal antibody I-1D of the IgG1 class which specifically reacts only with human fibrin D-dimer without cross-reaction with fibrinogen and fibrin was obtained earlier by the authors. In this work, the significant increase of the binding affinity of this antibody to D-dimer after heating at 63 °C during 10 min has been discovered. The other our D-dimer-specific monoclonal antibody III-3b doesn't change its properties after heating and was used as a control. Monoclonal antibody I-1D could be further used for the study of structural changes in a molecule of immunoglobulin.

Keywords: fibrinogen, fibrin, D-dimer, monoclonal antibodies, thrombosis, diagnostic test systems.