

УДК 612.017.2

М. В. Горіла, Т. М. Полішко, А. М. Аношко, І. А. Кленіна, Н. І. Штеменко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара,
НДІ гастроентерології*

ЗАКОНОМІРНОСТІ ВЗАЄМОДІЇ АНТИГЕН–АНТИТІЛО У РОЗЧИНАХ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ ТА ЦИСПЛАТИНУ

Досліджено вплив кластерних сполук ренію з різноманітними лігандами на реакцію антиген–антитіло з використанням імунодифузійних та імуноелектрофоретичних методів. Показано принципово різний характер впливу зазначених агентів на імунохімічні взаємодії. Проаналізовано закономірності впливу даних агентів на реакцію між імуноглобулінами людини та антитілами до них.

М. В. Горелая, Т. М. Полишко, А. М. Аношко, И. А. Кленина, Н. И. Штеменко

*Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара,
НИИ гастроэнтерологии*

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИГЕН–АНТИТЕЛО В РАСТВОРАХ КЛАСТЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РЕНИЯ И ЦИСПЛАТИНА

Исследовано влияние кластерных соединений рения с различными лигандами на реакцию антиген–антитело с использованием иммунодиффузионных и иммуноэлектрофоретических методов. Показан принципиально разный характер их влияния на иммунохимические взаимодействия. Проанализированы закономерности влияния данных агентов на реакцию между иммуноглобулинами человека и антителами против них.

М. V. Gorelaya, T. M. Polishko, A. M. Anoshko, I. A. Klenina, N. I. Shtemenko

Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University, Gastroenterology SRI

SOME COMMON FEATURES OF ANTIGEN–ANTIBODY INTERACTIONS IN SOLUTIONS OF RHENIUM CLUSTER COMPOUNDS AND CISPLATINE

Influence of rhenium cluster compounds with different ligands on the antigen-antibody reactions by immunodiffusial and immunoelectrophoretical methods was studied. The different characters of influence of these agents on the immunochemical interactions are shown. Some common features of the rhenium compounds influence on the reactions with human immunoglobulins and antibodies are discussed.

Вступ

Клінічне використання цисплатину має багато серйозних проблем. Значна частина препарату швидко інактивується, зв'язуючись із білками крові, і зовсім не досягає пухлини в активній формі [8]. Зв'язування з білками вважають головною причиною обмежень введення дози цисплатину, його нефро-, гепато- та нейротоксичності [6; 7]. У наших попередніх роботах представлено нову ефективну протипухлинну систему

реній-платина, у якій цисплатин уводиться одноразово на фоні введення кластерних сполук ренію за схемою антиоксидантної терапії [5; 10]. Подальше впровадження системи у медичну практику пов'язане зі всебічним вивченням біохімічних характеристик сполук ренію. Нами показано [5; 10], що комплексні сполуки ренію взаємодіють із білками сироватки крові людини. Важливою частиною введення нових препаратів у медичну практику є дослідження їх імуномодулювальних властивостей. Отже, мета даної роботи – виявити закономірності впливу групи комплексних сполук ренію на реакції антиген–антитіло (Ag–Ab) за допомогою імунохімічних методів [1], порівняти та з'ясувати відмінності їх взаємодії з білками крові людини.

Матеріал і методи досліджень

Визначено оптимальний титр сироваток окремо для взаємодії: анти-IgG, анти-IgA, анти-IgM, поліспецифічної антисироватки до білків крові людини та оптимальну кількість стандартної сироватки. Об'єкти досліджень – кластерні сполуки ренію (III) з різними лігандами:

1. $Na_2[Re(HPO_4)_4 \times 2H_2O]$ – натрій диаква-тетра- μ -гідрофосфатодиренат (III);
2. $Re_2Ac_2Cl_4 \times 2ДМАА$ – бісацетамідо-цис-тетрахлорди- μ -ацетатодиреній (III);
3. $Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$ – дихлоротетра- μ -(і-бутирато)-диреній(III);
4. $[Re_2(GABA)_2Cl_5(H_2O)] * Cl * H_2O$ – акватетрахлороцис-ди- μ - γ -амінобутиратодиреній (III) аквахлорид;
5. $[GABA]_2Re_2Cl_8$ – γ -амінобутироній октахлородиренат (III);
6. $(NH_4)_2[Re_2(HPO_4)_4] 2H_2O$ – амонійдиакватетра- μ -гідрофосфатодиренат (III);
7. $Re_2Ac_2Cl_4 \times 2ДМФА$ – бісформамідо-цис-тетрахлорди- μ -ацетатодиреній (III);
8. $Re_2Ac_2Cl_4 \times 2H_2O$ – диаква-цис-тетрахлорди- μ -ацетатодиреній (III);
9. $K_2[Re_2(HPO_4)_4 \times 2H_2O]$ – калій диаква-тетра- μ -гідрофосфатодиренат (III);
10. $Re_2Ac_2Cl_4 \times 2ДМСО$ – біс-диметилсульфоксидо-цис-тетрахлорди- μ -ацетатодиреній (III);
11. $Re_2(CH_3COO)_4HPO_4$ – гідрофосфато-тетра- μ -ацетатодиреній (III);
12. $Cs_2[Re_2(HPO_4)_4] * 2H_3PO_4$ – цезійдиортофосфатотетра- μ -гідрофосфатодиренат (III);
13. $Re_2(AdCOO)_2Cl_4 * 2CH_3CN$ – диацетонітріло-цистетрахлорди- μ -адамантидиреній, де *Ad* – адамантанова кислота;
14. $Re_2(AdCOO)_2Br_4 * 2CH_3CN$ – диацетонітріло-цистетрабромоди- μ -адамантидиреній, де *Ad* – адамантанова кислота.

Готувалися водні розчини сполук у діапазоні концентрацій від 10^{-3} до 10^{-11} . Взаємодія антиген–антитіло вивчалася за допомогою методів імунодифузії за Ухтерлоні та Манчині, а також методів ракетного та перехресного імуноелектрофорезів [1; 3; 4]. Як антиген використовували стандартну сироватку крові людини (виробництво підприємства бакпрепаратів ДНДІЕМ, м. Нижній Новгород, Росія) та груп здорових донорів, сироватковий альбумін людини. Антитілами були моноспецифічні сироватки проти IgA, IgG, IgM, поліспецифічні сироватки проти білків крові людини (виробництво підприємства бакпрепаратів ДНДІЕМ, м. Нижній Новгород, Росія). Досліди проводили за умови попередньої інкубації сполук ренію з антигеном (+37 °C, 1 година). Усі експерименти проводили у шестикратному повторенні. Вивчали зсуви імунопреципітаційних ліній під час імунодифузії за Ухтерлоні, зміни діаметра преципітаційних кіл із пластинок імунодифузії за Манчині та зміни площі імуноелектрофоретичних піків із пластинок ракетного та перехресного імуноелектрофорезів порівняно з контролем. Статистичну обробку даних проводили за Г. Ф. Лакінім [2].

Результати та їх обговорення

Вивчення закономірностей взаємодії кластерних сполук ренію дає змогу не лише порівняти отримані ефекти, а також з'ясувати деякі аспекти міжмолекулярної взаємодії згаданих сполук. Дослідження взаємодії сполук ренію з білками за допомогою сучасних імунохімічних методів надає можливість виявити особливості їх зв'язування з компонентами живого організму, механізму детоксикації та багато інших. До суттєвих переваг імунохімічних методів належать точність і чутливість імунохімічних методів аналізу, заснованих на специфічному зв'язуванні антитіл із даним антигеном, що не мають собі рівних і широко використовуються у біологічних дослідженнях [1]. Чутливість методів дуже висока (від 10^{-6} до 10^{-12} моль/л). У жодному з експериментів із застосуванням кластерних сполук ренію не спостерігали відсутності або часткового розчинення імунопреципітатів порівняно з контрольними дослідженнями, що можна пояснити низькою молекулярною вагою цих речовин і вірогідним їх зв'язуванням із частиною молекул білків, віддаленою від активного центру зв'язування антиген–антитіло. Проте в усіх без винятку досліджах у діапазоні концентрацій комплексних речовин від 10^{-8} до 10^{-10} моль/л мала місце зміна характеру впливу на імунохімічні взаємодії, що вірогідно пов'язано з терапевтичним пороговим значенням концентрацій багатьох існуючих лікарських препаратів.

Усі комплексні сполуки ренію можна умовно поділити на чотири групи за характером їх впливу на імунохімічні реакції. Перша група складається з неактивних сполук, що майже не впливають на імунохімічні взаємодії. Статистично достовірних змін із застосуванням наших методів виявити у цій групі не вдалося. Це сполуки під номерами 1 та 2 із переліку речовин. До другої групи належать сполуки, що мають низький пригнічувальний або стимулювальний вплив на реакцію антиген–антитіло, який не перевищує 10 % від контролю. Це – більшість досліджених сполук (3–12). До третьої групи входять сполуки, що мають значний пригнічувальний вплив і порівняно високу негативну активність – цезієвий комплекс диренію (11) та цисплатин. До четвертої групи сполук, що активують імунохімічні взаємодії, входять адамантанові комплекси ренію (13, 14). Як приклад наводимо інтенсивність утворення преципітатів із деякими комплексами (табл. 1).

Таблиця 1

Інтенсивність утворення імунопреципітатів (% від контролю) під впливом кластерних сполук ренію та цисплатину

Формула сполуки	Взаємодія з IgM (%)		
	концентрація сполуки, 10^{-6} моль/л	концентрація сполуки, 10^{-8} моль/л	концентрація сполуки, 10^{-10} моль/л
$Re_2(AdCOO)_2Br_4 \cdot 2CH_3CN$	135	153	171
$Cs_2[Re_2(HPO_4)_4] \cdot 2H_3PO_4$	85	71	70
Цисплатин	59	60	81

Остання, четверта група стимулювальних сполук – найцікавіша та найперспективніша як у плані отримання у майбутньому нових лікарських препаратів, так і відносно використання речовин як підсилувачів імунохімічних взаємодій у фундаментальних дослідженнях. Найактивнішими стимулювальними агентами тут виявилися адамантанові комплекси ренію.

Властивості адамантанових комплексних сполук свідчать про можливу їх багатофункціональність та відкривають найбільші перспективи у подальших дослідженнях. Безперечно, двоатомне ядро кластерних сполук ренію – найголовніший агент під час взаємодії з білковою молекулою, але важливу роль відіграє лігандне оточення. Із ре-

зультатів наших експериментів впливає така закономірність: чим розчинніший у фізіологічних умовах ліганд, тим більш реакційноздатна комплексна сполука в цілому. У ряду органічних лігандів, за даними імунодифузії за Манчині, реакційна здатність зменшується у порядку: DMSO > DMFA > DMAA. Серед металів як ліганди найактивніші – цезій (пригнічував реакцію), калій, натрій. Ці факти узгоджуються з уявленнями про роль іонів металів у клітині: цезій – токсичний замітник кальцію, а калій (на відміну від натрію) – внутрішньоклітинний іон. Можна також зробити спостереження: як ліганд атоми хлору сприяли утворенню активнішої в імунохімічному плані сполуки, ніж атоми бром.

Найбільшим змінам піддавалися IgM та IgA, ніж IgG, вірогідно в силу різної будови цих макромолекул, оскільки IgM є пентамером, а IgA – димером. Отже, ряд активності імуноглобулінів з погляду впливу на них кластерних сполук ренію у середньому є таким: IgM > IgA > IgG. Для визначення точного місця зв'язування кластерних сполук ренію потрібні, безумовно, додаткові дослідження. Вірогідно, що комплексні сполуки ренію зв'язуються з молекулою білка через імідазольне кільце амінокислоти гістидину [10], через сірковмісні зв'язки амінокислот цистеїну та, можливо, метіоніну.

Висновки

Вперше досліджено вплив кластерних сполук ренію на імунохімічні взаємодії білків сироватки крові людини – імуноглобулінів (IgA, IgG, IgM). Виявлено різний характер впливу на реакцію антиген–антитіло в умовах інкубації з антигеном. Зміни антигенних властивостей можуть бути пов'язані з конформаційними змінами білків під впливом комплексних сполук ренію, але це не призводить до повного зсуву комплементарності у ділянках взаємодії антигенів з антитілами.

Бібліографічні посилання

1. **Березин В. А.** Иммунохимические методы анализа / В. А. Березин, Г. М. Шевченко, В. О. Павлов. – Д. : Изд-во ДГУ, 1992. – 84 с.
2. **Лакин Б. Ф.** Биометрия. – М. : Наука, 1990. – 280 с.
3. **Поттер Е. У.** Иммунология. Практикум. – К. : Наукова думка, 1989. – 343 с.
4. **Фримель Х.** Основы иммунологии. – М. : Наука, 1986. – 346 с.
5. **Штеменко Н. І.** Дослідження впливу кластерних сполук ренію на взаємодію антиген–антитіло методом імунодифузії за Ухтерлоні / Н. І. Штеменко, М. В. Горіла, Л. М. Александрова // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2002. – Вип. 10, Т. 2. – С. 100–104.
6. **Calvert Н.** Platinum complexes in cancer medicine: pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to toxicity and therapeutic activity / Н. Calvert, Y. Judson, W. J. Vijn // *Cancer Surv.* – 1993. – N 17. – P. 189–217.
7. **Hacker M. P.** Toxicity of anticancer drugs. – NY : Ed. Mc Graw-Hill, 1991. – 282 p.
8. **Howe-Grant M. E.** Aquacous platinum (II) chemistry; binding to biological molecules / M. E. Howe-Grant, S. I. Lippard // *Metal ions in Biological systems* / H. Siegel, ed. – NY: Marcel Dekker, 1980. – Vol. 11. – P. 63–125.
9. **Keppler B. K.** Anti-tumor properties of metal complexes / B. K. Keppler, E. A. Vogel // *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids – bioinorganic medicine.* – NY : Academic Press Limited, 1995. – Vol. 2, N 3. – P. 1200–1229.
10. **Shtemenko N. I.** Interaction of Rhenium cluster compounds with human blood proteins / N. I. Shtemenko, M. V. Gorelaya, L. M. Alexandrova // *Metal Ions in Biology and Medicine.* – 2002. – Vol. 7. – P. 34–36.

Надійшла до редколегії 07.11.2009