

УДК 557.77.51.03

## ПАРАМЕТРЫ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ С РЕКОМБИНАНТНЫМ АНАЛОГОМ ГЛИКОПРОТЕИНА G ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 2-ГО ТИПА

Л. Н. Коршун<sup>1</sup>  
Г. В. Ковтонюк<sup>1</sup>  
Л. Н. Мойса<sup>1</sup>  
Е. К. Киселева<sup>1</sup>  
Л. А. Ганова<sup>1,2</sup>  
М. И. Вудмаска<sup>1</sup>  
Н. Я. Спивак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НПК «Диапроф-Мед», Киев

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: KL2004@ukr.net

Получено 09.02.2012

Определяли параметры специфического взаимодействия, такие как аффинность и авидность, сывороточных IgG в процессе образования иммунокомплекса с рекомбинантным антигеном вируса простого герпеса 2-го типа.

В ходе проведенных исследований было установлено, что все положительные к этому вирусу сыворотки содержат высокоаффинные антитела (показатель степени константы аффинности находился в диапазоне  $10^7-10^8 \text{ M}^{-1}$ ). Наивысшее значение индекса авидности ( $81,15 \pm 11,15\%$ ) наблюдалось у антител сыворотки № 2, а у образцов № 1 и № 3 эти значения были ниже: ( $62,50 \pm 15,50\%$ ) и ( $65,0 \pm 15,10\%$ ) соответственно, хотя достоверное различие между ними отсутствовало ( $P > 0,05$ ). Полученные результаты оценки авидности этих сывороток хорошо согласовались с теоретическими значениями констант аффинности, которые определяли в формате непрямого иммуоэнзимного анализа согласно методу Фриге и др. с использованием уравнений Скэтчарда, Клотца, а также уравнения Стивенса.

Для одной из сывороток (№ 4) установлено расхождение между величиной аффинности и уровнем авидности антител. Так, значение константы аффинности, рассчитанное с помощью уравнения Стивенса, составляло  $(2,08 \pm 0,25) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ , при этом индекс авидности антител ( $23,50 \pm 6,50\%$ ) был достоверно ниже ( $P < 0,05$ ) относительно высокоавидных сывороток.

Полученные результаты являются весомым вкладом в усовершенствование существующих методов лабораторной диагностики вируса простого герпеса, а также обнаружения вирусспецифических антител в сыворотке крови.

**Ключевые слова:** вирус простого герпеса 2-го типа, иммуоэнзимный анализ, константа аффинности, авидность антител.

В последнее десятилетие во многих странах мира отмечают высокие темпы роста заболеваний, вызываемых вирусом простого герпеса (ВПГ) [1]. Этот возбудитель является вторым после краснухи тератогенным вирусным агентом, способствующим развитию внутриутробной патологии и неонатальной инфекции. Особенно велика роль вируса простого герпеса второго типа (ВПГ-2) в генезе самопроизвольных выкидышей, преждевременных родов и внутриутробной гибели плода [2]. Несмотря на то что современная медицина располагает новейшими данными об этиологии, патогенезе герпети-

ческой инфекции и путях ее распространения, разработаны высокочувствительные лабораторные методики для выявления ВПГ, синтезированы различные лекарственные средства, все еще остаются нерешенными многие проблемы как социального, так и медицинского характера. Ситуация осложняется из-за многообразия клинических форм проявления заболевания, включая атипичные, субклинические и бессимптомные формы, а также вследствие вовлечения в инфекционный процесс различных систем организма, что затрудняет специфическую диагностику возбудителя [1, 3].

Существующие методы лабораторной диагностики основаны на выделении и идентификации ВПГ, а также на обнаружении вирусспецифических антител в сыворотке крови. Диагностическое значение серологических методов при простом герпесе различно и зависит от формы инфекции (первичная, рецидивирующая), состояния реактивности организма, длительности заболевания и других факторов. Рецидивирующий герпес обычно протекает на фоне высоких показателей уровней антител класса G, свидетельствующих о постоянной антигенной стимуляции организма. Низкие титры IgG не всегда указывают на отсутствие активной герпетической инфекции, выявление же титров выше средних является показанием к дополнительному обследованию, в частности определению показателя авидности иммуноглобулинов класса G [3, 4].

Среди серологических методов наиболее широкое распространение получил твердофазный иммуноэнзимный анализ (ИЭА). Во многих коммерческих тест-системах в состав иммуносорбента входит рекомбинантный аналог гликопротеина G, который расположен на поверхностной оболочке вирусных частиц [3, 4]. Ранее нами была сконструирована плазида, содержащая иммунодоминантные области этого протеина и показана возможность использования продукта бактериальной экспрессии — слитого с глутатион-S-трансферазой полипептида GST-HSV2gG для обнаружения иммуноглобулинов класса G [5]. При этом остался открытым вопрос о степени сродства сывороточных антител к искусственному антигену, что и послужило целью нашей работы, которая заключалась в определении параметров специфического взаимодействия, таких как аффинность и авидность IgG, в процессе образования иммунокомплекса с рекомбинантным протеином вируса простого герпеса 2-го типа.

### Материалы и методы

*Рекомбинантный протеин GST-HSV2gG.* В работе использовали рекомбинантный протеин GST-HSV2gG, экспрессируемый в бактериальных клетках штамма-реципиента *E. coli BL21 (DE3) [F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) gal λ(DE3)]*. Выделение целевого продукта из клеточной биомассы и его хроматографическую очистку проводили согласно ранее опубликованной методике [5].

*Сыворотки крови.* Для тестирования использовали четыре положительных к

ВПГ-2 образца сывороток крови доноров из внутрипроизводственной панели (ВПП, НПЖ «Диапроф-Мед»). Содержание иммуноглобулинов класса G в сыворотках было подтверждено с помощью иммуноэнзимной тест-системы Herpes Simplex Virus HSV-Type 2 IgG-ELISA (Ltd.Nova Tec., Германия).

*Иммуноэнзимный анализ.* Для приготовления иммуносорбента применяли полистироловые 96-луночные планшеты (Nunc), в лунки которых сорбировали рекомбинантный протеин GST-HSV2gG в концентрации 0,3 мкг/мл в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6) и выдерживали при температуре 4 °С в течение 16–18 ч. После иммобилизации антигена свободные сайты на поверхности носителя блокировали с помощью раствора сухого обезжиренного молока. Затем в лунки прибавляли исследуемые сыворотки, планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Образовавшиеся специфические иммунные комплексы выявляли с использованием пероксидазного конъюгата мышинных моноклональных антител, специфичных к IgG человека.

В качестве проявителя иммуноэнзимной реакции применяли хромоген тетраметилбензидин (ТМБ), разведенный в цитратном буфере с добавлением пероксида водорода. Реакцию останавливали, добавляя в лунки 0,5 М раствор серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре Labsystems Multiskan (Финляндия) в двухволновом режиме 450/620 нм.

*Определение константы аффинности сывороточных антител к рекомбинантному протеину GST-HSV2gG.*

Для подавления неспецифической активности полиреактивных иммуноглобулинов, присутствующих в сыворотках крови, образцы разводили в буферных растворах с добавлением 0,1% Твина-20 [6]. Необходимое рабочее разведение антител предварительно определяли из калибровочного графика. Для этого рекомбинантный протеин GST-HSV2gG разводили в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6) и в концентрации 0,3 мкг/мл сорбировали в лунки планшетов, которые выдерживали в течение 16–18 ч при температуре 4 °С. После иммобилизации раствор из лунок удаляли, планшеты трижды промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% Твина-20 (ФСБТ). Затем готовили двукратные разведения сывороток в ФСБТ начиная с 1:2 до 1:128. Полученные образцы вносили в лунки планшета с иммобилизованным антигеном и инкубировали в течение 1 ч. Из графика

ка зависимости величины оптической плотности от логарифма разведения на основе пробит-анализа вычисляли разведение сыворотки, которое соответствовало 50%-му снижению сигнала окрашенных лунок, т. е. двукратно-му уменьшению количества связавшихся с носителем антител [7].

Величину константы аффинности специфических к ВПГ-2 сывороточных антител определяли согласно методу Фриге и др. [8] с использованием уравнений Скэтчарда (1) и Клотца (2), представленных в форме линейной регрессии:

$$\frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot \frac{1}{L_i} = \frac{1}{K_d} \left(1 - \frac{A_0 - A_i}{A_0}\right); \quad (1)$$

$$\frac{A_0}{A_0 - A_i} = 1 + \frac{K_d}{L_i}. \quad (2)$$

Поскольку определяемое с помощью ИЭА количество свободных молекул IgG и паратопов не тождественно, для устранения этого несоответствия Стивенс [9] предложил вычислять корень квадратный из уравнения Клотца:

$$\sqrt{\frac{A_0}{A_0 - A_i}} = 1 + \frac{K_d}{L_i}, \quad (3)$$

где  $K_d$  — значение константы диссоциации (моль/л, М), которая обратно пропорциональна константе равновесия (аффинности)  $K_a = 1/K_d$  (л/моль,  $M^{-1}$ ),  $L_i$  — общая концентрация конкурирующего антигена (моль, М),  $A_i$  — оптическая плотность реакционной смеси, соответствующая количеству свободных антител в условиях динамического равновесия,  $A_0$  — оптическая плотность окрашенных лунок в отсутствие конкурирующего антигена ( $L_i = 0$ ).

К рабочему разведению сыворотки, рассчитанному по вышеуказанной схеме, вносили различные концентрации антигена GST-HSV2gG (от  $0,04 \cdot 10^{-8}$  до  $40 \cdot 10^{-8}$  М) в соотношении 1:1. Смеси инкубировали в течение ночи при температуре 37 °С, а затем по 100 мкл каждого образца переносили в 96-луночный планшет с предварительно иммобилизованным протеином и выдерживали еще 1 ч при температуре 37 °С. В контрольных пробах сывороток отсутствовал конкурирующий антиген. После завершения процедуры непрямого ИЭА вычисляли средние значения оптической плотности лунок для каждого разведения, взятого не менее чем в четырех повторах.

На основе полученных данных были построены кривые зависимости связанных или свободных антител от концентрации

конкурирующего антигена, а из соответствующих уравнений линейной регрессии определяли величины констант аффинности или диссоциации. Для аппроксимации экспериментальных кривых использовали параметры линейной регрессии, рассчитанные в соответствии с уравнением Скэтчарда, представленного в виде зависимости:  $Y = ((A_0 - A_i)/A_0)(1/L_i)$  от  $X = (A_0 - A_i)/A_0$ . Теоретические значения оптической плотности определяли по формуле:  $A_i = A_0(1 - X)$ .

Достоверность полученных результатов оценивали методами регрессионного анализа с помощью статистических показателей линейной регрессии, таких как угловой коэффициент, соответствующий величине  $K_a$  (в уравнении 1) или  $K_d$  (для уравнений 2 и 3), и его стандартная ошибка, коэффициент детерминации ( $R^2$ ), критерии Стьюдента (*t-критерий*) или Фишера (*F-тест*) [10–12]. Вычисления производили с использованием статистической функции «Линейная» компьютерной программы Excel.

*Определение avidности специфических иммуноглобулинов класса G к ВПГ-2.*

Авидность исследуемых сывороток определяли с помощью тест-системы DIA-HSV2-IgG-av (производство НПК «Диапроф-Мед», Украина) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Диагностический набор сконструирован в формате непрямого ИЭА. Образцы сывороток инкубировали в двух параллельных лунках иммуносорбента, одну из них промывали в обычном режиме, а другую обрабатывали специальным диссоциирующим раствором, обуславливающим разрушение комплекса антигена с низкоавидными антителами. Индекс avidности рассчитывали как отношение величины оптической плотности, полученной при выявлении специфических антител в присутствии диссоциирующего агента к оптической плотности образца без обработки диссоциирующим раствором. Учет результатов осуществляли согласно рекомендациям фирмы-производителя: если индекс avidности был менее 30%, то исследуемая сыворотка содержала низкоавидные антитела, индекс avidности в диапазоне 30–60% соответствовал сывороткам со средней avidностью, показатель свыше 60% имели высокоавидные к ВПГ-2 сывороточные антитела.

### Результаты и обсуждение

Известно, что общая популяция антител иммунной сыворотки содержит иммуноглобулины различной аффинности, которые

гетерогенны по своим физико-химическим свойствам, поэтому экспериментально определяемая константа равновесия является некоторым эффективным параметром [6, 12]. В настоящее время разработаны специальные методы для определения аффинности антител. Принцип каждого из них заключается в том, чтобы создать условия, необходимые для достижения состояния динамического равновесия в системе антиген-антитело, а затем измерить концентрацию свободного и связанного антигена (или антител). Используя полученные данные, на основе закона действующих масс можно вычислить константу равновесия, соответствующую константе аффинности ( $K_d$ ). Теоретические аспекты специфического комплексообразования хорошо описаны в научной литературе [8, 9, 12, 13].

В настоящей работе предпринята попытка дать сравнительную оценку величине константы аффинности сывороточных антител по отношению к рекомбинантному протеину *GST-HSV2gG*, рассчитанную с помощью различных математических уравнений. Как показал графический анализ, экспериментальные данные для всех сывороток хорошо аппроксимируются с помощью уравнения линейной регрессии. При этом тангенс угла наклона прямой соответствует константе равновесия (аффинности) в уравнении Скэтчарда (рис. 1) или константе диссоциации в случае использования уравнений Клотца или Стивенса (рис. 2 и рис. 3, соответственно).

В некоторых публикациях авторы высказывают мнение о том, что использование линейных зависимостей от обратных концентраций реагентов может привести к существенному снижению точности определения искомых величин [13]. В наших экспериментах, как следует из таблицы, значения констант аффинности сывороточных антител, рассчитанных с помощью уравнений 1 и 2, не имеют достоверных различий ( $P > 0,05$ ), в то время как использование уравнения Стивенса приводит к увеличению константы аффинности в 2–3 раза, что согласуется с данными литературы [9, 13].

На рис. 5 представлена теоретически рассчитанная зависимость образующегося иммунного комплекса от концентрации конкурирующего антигена *GST-HSV2gG* в смеси с сывороточными антителами против ВПГ-2. Из графика видно, что для всех образцов сывороток полученная кривая имеет вид прямоугольной гиперболы, аналогичной по форме изотерме адсорбции уравнения Лэнгмюра в теории физической

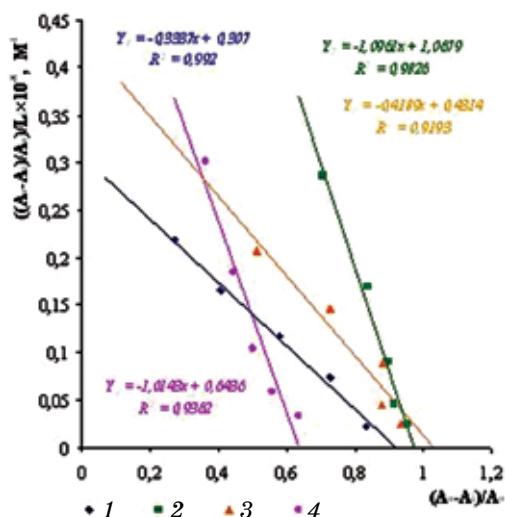


Рис. 1. Определение равновесной константы связывания специфических IgG сыворотки крови с рекомбинантным протеином GST-HSV2gG в координатах уравнения Скэтчарда (согласно модификации Фриге и др. [8]):

на графике представлена зависимость отношения количества связанных в иммунокомплексе антител к общей концентрации антигена (ось Y) от количества связанных антител (ось X). Точками обозначены экспериментальные данные. Цифры с маркерами соответствуют номерам исследуемых сывороток. Соответствующие значения констант аффинности приведены в таблице

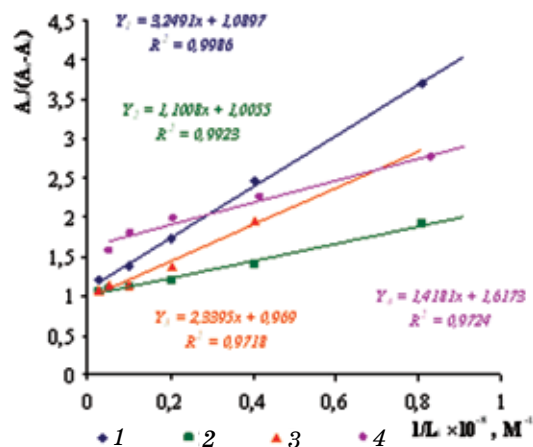


Рис. 2. Графическое определение константы диссоциации ( $K_d$ ) сывороточных антител в процессе образования иммунного комплекса с рекомбинантным антигеном GST-HSV2gG в координатах уравнения Клотца (согласно модификации Фриге и др. [8]):

точками обозначены экспериментальные данные. Теоретические значения констант диссоциации для исследуемых сывороток: № 1 —  $K_d = (3,249 \pm 0,07) \cdot 10^{-8}$  М; № 2 —  $K_d = (1,101 \pm 0,05) \cdot 10^{-8}$  М; № 3 —  $K_d = (2,34 \pm 0,23) \cdot 10^{-8}$  М; № 4 —  $K_d = (1,418 \pm 0,14) \cdot 10^{-8}$  М.

Цифры с маркерами соответствуют номерам образцов исследуемых сывороток. Показатели констант аффинности приведены в таблице

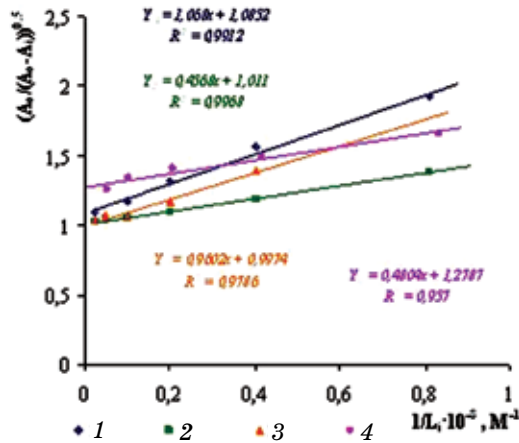


Рис. 3. Определение констант диссоциации сывороточных антител с рекомбинантным протеином GST-HSV2gG в координатах уравнения Стивенса (3):

точки на графике — экспериментальные данные. Теоретические значения констант диссоциации:

$$K_d = (1,068 \pm 0,06) \cdot 10^{-8} \text{ М для сыворотки №1;}$$

$$K_d = (0,457 \pm 0,01) \cdot 10^{-8} \text{ М для сыворотки №2;}$$

$$K_d = (0,960 \pm 0,08) \cdot 10^{-8} \text{ М для сыворотки №3;}$$

$$K_d = (0,480 \pm 0,06) \cdot 10^{-8} \text{ М для сыворотки №4.}$$

Цифры с маркерами соответствуют номерам образцов исследуемых сывороток. Соответствующие значения констант аффинности приведены в таблице

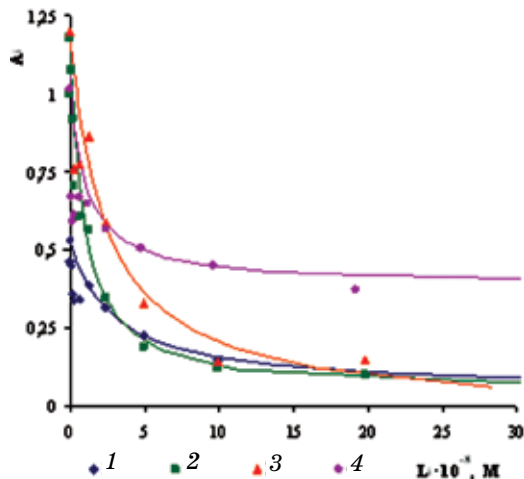


Рис. 4. Определение количества «свободных» антител в смеси с различными концентрациями конкурирующего антигена GST-HSV2gG:

точки на графике — экспериментальные данные, соответствующие величине оптической плотности окрашенных лунок ( $A_i$ ). Теоретические кривые построены с использованием параметров линейной регрессии, рассчитанных согласно уравнению Скэтчарда (1). Показатели оптической плотности лунок в отсутствие конкурирующего антигена ( $A_0$ ) для исследуемых сывороток:

$$A_0 = 0,529 \text{ (сыворотка №1);}$$

$$A_0 = 1,176 \text{ (сыворотка №2);}$$

$$A_0 = 1,199 \text{ (сыворотка №3);}$$

$$A_0 = 1,014 \text{ (сыворотка №4).}$$

Цифры с маркерами соответствуют номерам образцов сывороток

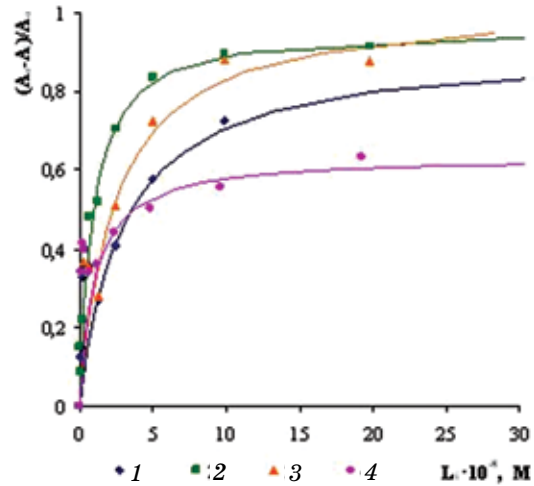


Рис. 5. Кривые зависимости образующегося иммунного комплекса от концентрации антигена GST-HSV2gG в смеси с сывороточными антителами класса G против ВПГ-2:

точками на графике обозначены экспериментальные данные. Теоретические кривые построены с использованием параметров линейной регрессии, рассчитанных согласно уравнению Скэтчарда (1). Цифры с маркерами соответствуют номерам исследуемых сывороток

адсорбции или кривой энзимсубстратного взаимодействия, описываемой уравнением Михаэлиса–Ментен. Это свидетельствует о том, что иммунная реакция между антигеном и антителом является обратимым процессом и характеризуется теми же кинетическими закономерностями, как и любое другое явление комплексообразования [14].

Как следует из таблицы, все исследуемые сыворотки имеют показатель степени константы аффинности в диапазоне  $10^7$ – $10^8 \text{ М}^{-1}$ , что позволяет характеризовать их как высокоаффинные.

Определение количества свободных антител методом ИЭА показало (рис. 4), что у образца сыворотки № 4 часть антигенсвязывающих сайтов остаются незаблокированными конкурирующим антигеном. Это количество, как видно из рис. 5, составляет около 40%. Такую «аномалию» можно объяснить двумя причинами. Во-первых, тем, что в реагирующей системе не было достигнуто состояние динамического равновесия, однако в экспериментальных условиях инкубацию реагентов проводили в течение ночи (согласно методике Фриге), хотя по некоторым публикациям для этого достаточно всего 2–4 ч [15]. Во-вторых, присутствием в сыворотке полиреактивных иммуноглобу-

Сравнительная оценка константы аффинности сывороточных IgG к рекомбинантному протеину GST-HSV2gG

Номер образца сыворотки	Величина константы аффинности, M <sup>-1</sup>		
	Уравнение Скэтчарда (1)	Уравнение Клотца (2)	Уравнение Стивенса (3)
1	$(3,34 \pm 0,02) \cdot 10^7$	$(3,10 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(9,36 \pm 0,05) \cdot 10^7$
2	$(1,10 \pm 0,08) \cdot 10^8$	$(9,10 \pm 0,04) \cdot 10^7$	$(2,19 \pm 0,06) \cdot 10^8$
3	$(4,20 \pm 0,07) \cdot 10^7$	$(4,27 \pm 0,04) \cdot 10^7$	$(1,04 \pm 0,10) \cdot 10^8$
4	$(1,01 \pm 0,15) \cdot 10^8$	$(7,10 \pm 0,07) \cdot 10^7$	$(2,08 \pm 0,25) \cdot 10^8$

*Примечание.* В таблице представлены средние значения и стандартные ошибки константы аффинности ( $K_d$ ).

линов, которые могут неспецифически взаимодействовать с антигенными детерминантами, однако все опытные растворы (в том числе и для сывороток №1–3) содержали 0,1% Твина-20, который эффективно устраняет влияние данного фактора [6].

Попытаемся дать объяснение этому явлению. Известно, что иммуноглобулины класса G являются двухвалентными, поэтому после экспозиции с антигеном в качестве «свободных» в ИЭА будут выявляться антитела, у которых оба паратопа не заняты антигенами, либо антитела, у которых один паратоп заблокирован, а второй — свободен [12, 16]. Поскольку образование иммунных комплексов — процесс обратимый, то нековалентные связи между паратопами и эпитопами способны диссоциировать. Поэтому количество свободных антител у образца сыворотки № 4 может увеличиваться из-за более слабой силы взаимодействия с иммунодоминантными областями рекомбинантного протеина. Из литературных источников хорошо известно, что для математического описания процесса комплексообразования в системе антиген–антитело за основу берут простую модель взаимодействия одновалентного антигена (гаптена) и одновалентного антитела. Но такая характеристика образования иммунокомплекса является слишком упрощенной, так как природные антитела содержат несколько антигенсвязывающих центров (паратопов), а молекула антигена может иметь несколько антигенных детерминант (эпитопов). В последнем случае прочность связывания значительно выше [12]. Этот феномен называют усиливающим эффектом поливалентности (enhancement factor)

[17]. Для описания такого сложного реально существующего процесса специфического взаимодействия был введен термин «авидность» (или функциональная аффинность).

Определить авидность антител в эксперименте значительно сложнее, чем аффинность взаимодействия, хотя в специальной литературе описаны различные подходы [18]. В этой связи несомненный интерес представляла оценка авидности специфических к ВПГ-2 антител в составе поликлональных сывороток, для которых теоретически были рассчитаны константы аффинности. Результаты определения индекса авидности с помощью тест-системы DIA-HSV2-IgG-av (производство НПК «Диапроф-Мед») представлены на рис. 6.

Как видно из диаграммы, наиболее высокое значение индекса авидности ( $81,15 \pm 11,15$ )% наблюдалось у сыворотки №2, что позволяет характеризовать специфичные к ВПГ-2 антитела как высокоавидные, а для образцов №1 и №3 эти значения были несколько ниже: ( $62,50 \pm 15,50$ )% и ( $65,0 \pm 15,10$ )%, что соответствует иммуноглобулинам со средним уровнем авидности, хотя достоверное различие между этими тремя образцами отсутствовало ( $P > 0,05$ ). Полученные результаты хорошо согласуются с теоретическими значениями констант аффинности для этих сывороток (таблица).

С другой стороны, у сыворотки № 4 величина индекса авидности антител равнялась ( $23,50 \pm 6,50$ )%, что было достоверно ниже ( $P < 0,05$ ) по сравнению с вышеприведенными образцами. Несмотря на то что эта сыворотка имела достаточно высокую константу аффинности (таблица), полученные данные позволяют оценивать ее как низко-

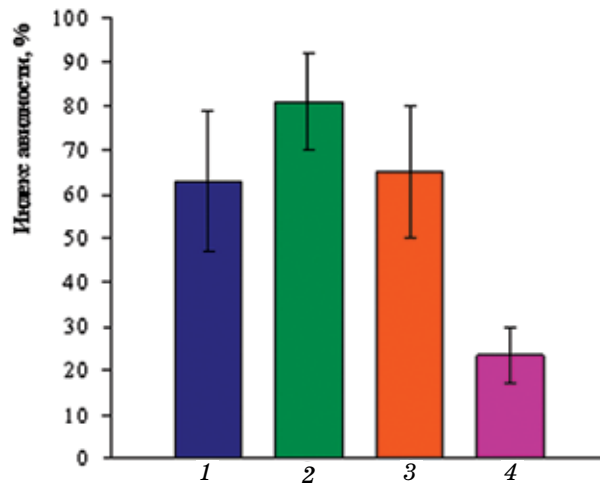


Рис. 6. Результаты определения индекса avidности специфических к ВПГ-2 сывороточных антител класса G: цифрами внизу обозначены номера исследуемых сывороток

авидную. Наблюдаемое расхождение между величинами аффинности и avidности можно объяснить тем, что часть двухвалентных IgG может быть связана с антигеном моновалентно либо только частично непрочной двухвалентной связью, что приводит к увеличению количества «свободных» антител [16]. В пользу этого свидетельствуют и некоторые публикации, где отмечается, что указанная связь может усиливаться в течение определенного периода времени (до 100 дней), и такой процесс называют «созреванием» антител [19, 20]. При этом на начальной стадии заболевания в сыворотке преобладают низкоавидные IgG, выявление которых повышает диагностическую ценность для установления факта первичного заражения ВПГ-2 [20, 21].

Такой сложный процесс комплексообразования в системе антиген–антитело создает определенные трудности как с точки зрения теоретической оценки, так и в ходе экспериментального измерения показателей. При этом бесспорным является тот факт, что именно avidность играет основную роль в иммунном ответе при инфицировании организма вирусами или бактериями [12], и ее величина зависит как от сродства индивидуальных антигенсвязывающих центров к определенным детерминантам антигена (собственно аффинности), так и от их количества [17]. Все это обуславливает необходимость проведения более тщательных исследований и всестороннего изучения механизмов специфического взаимодействия.

Таким образом, в ходе проведенных исследований было установлено, что все

положительные к ВПГ-2 сыворотки содержали высокоаффинные антитела к рекомбинантному аналогу гликопротеина G (порядок степени константы аффинности находился в диапазоне  $10^7$ – $10^8$   $M^{-1}$ ). Наивысшее значение индекса avidности ( $81,15 \pm 11,15$ )% наблюдалось у антител сыворотки № 2, а у образцов № 1 и № 3 оно было ниже: ( $62,50 \pm 15,50$ )% и ( $65,00 \pm 15,10$ )%, соответственно, хотя достоверное различие между образцами отсутствовало ( $P > 0,05$ ). Полученные результаты оценки avidности для этих сывороток хорошо согласовались с теоретическим значением константы аффинности ( $K_a$ ), которое определяли в формате непрямого ИЗА согласно методу Фриге и др. с использованием уравнений Скэтчарда, Клотца, а также уравнения Стивенса.

Для одной из сывороток (№4) было установлено расхождение между величиной аффинности и уровнем avidности антител. Так, значение константы аффинности, рассчитанное с помощью уравнения Стивенса, составляло  $(2,08 \pm 0,25) \cdot 10^8$   $M^{-1}$ , что свидетельствовало о наличии высокоаффинных антител класса G, но при этом значение индекса avidности ( $23,50 \pm 6,50$ )% было достоверно ниже ( $P < 0,05$ ) относительно высокоавидных сывороток.

Работа выполнена в рамках научного проекта ДЗ 492-2011 «Разработка, создание и испытание композитных нанобиоматериалов на основе наночастиц диоксида церия» по заказу Государственного агентства по вопросам науки, инноваций и информатизации Украины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казмирчук В. Е., Мальцев Д. В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. — К.: Феникс, 2009. — 248 с.
2. Куцак В. Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. — Кольцово: ЗАО «Вектор-Бест», 2004. — С. 22–57.
3. Ashley R., Friedrich D., Krantz E., Wald A. Development and use of a type-specific antibody avidity test based on Herpes Simplex Virus type 2 Glycoprotein G // Sex. Transm. Dis. — 2004. — V. 31, N 8. — P. 508–515.
4. Hashido M., Inouye S., Kawana T. Differentiation of primary from nonprimary genital herpes infections by a Herpes Simplex Virus-specific immunoglobulin G avidity assay // J. Clin. Microbiol. — 1997. — V. 35, N 7. — P. 1766–1768.
5. Коршун Л. Н., Мойса Л. Н., Ганова Л. А. и др. Влияние физиологического состояния клеток бактерий *Escherichia coli* на экспрессию растворимого белка — рекомбинантного аналога гликопротеина G вируса простого герпеса 2 типа // Микробиол. журн. — 2011. — Т. 73, № 5. — С. 36–46.
6. Esser P. Blocking agent and detergent in ELISA // Thermo Scientific Nunc Bulletin — N 9. — P. 1–4.
7. Gupta P., Han S.-Y., Holgado-Madruga M. et al. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody // BMC Biotechnol. — 2010. — V. 72, N 10. — P. 1–13.
8. Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // J. Immunol. Meth. — 1985. — N 77. — P. 305–319.
9. Stevens F. J. Modification of an ELISA-based procedure for affinity determination: correction necessary for use with bivalent antibody // Mol. Immunol. — 1987. — V. 24, N 10. — P. 1055–1060.
10. Лапач С. Н., Губенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2002. — 407 с.
11. Плохинский Н. А. Биометрия. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. — 367 с.
12. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Высш. шк., 1991. — 288 с.
13. Бобровник С. А. Анализ некоторых «неразрешимых» проблем определения параметров лиганд-рецепторного взаимодействия и способы их решения // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 6. — С. 5–28.
14. Варфоломеев С. Д., Гуревич К. Г. Молекулярная рецепция / Биокинетика: практический курс. — М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. — С. 335–496.
15. Берзофски Д. А., Берковер А. Дж. Эффекторные механизмы иммунитета / Иммунология, Т. 3. Под ред. У. Пола. — М.: Мир, 1989. — С. 5–47.
16. Бобровник С. А., Демченко М. А., Комисаренко С. В. Преимущества двух- или поливалентного связывания рецептора с лигандом перед одновалентным // Укр. біохім. журн. — 2011. — Т. 83, № 3. — С. 58–64.
17. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. — М.: Мир, 2000. — 592 с.
18. Бобровник С. А. Авидность IgG антител и ее теоретическая оценка // Укр. біохім. журн. — 2010. — Т. 82, № 2. — С. 111–117.
19. Альтшулер Е. П., Серебряная Д. В., Катруха А. Г. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности // Усп. биол. химии. — 2010. — Т. 50. — С. 203–258.
20. Inouye S., Hasegawa A., Matsuno S., Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: detections by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed // J. Clin. Microbiol. — 1984. — V. 20, N 3. — P. 525–529.
21. William L. H., Connie L., Ashley R. Use of a Glycoprotein G-based type-specific assay to detect antibodies to Herpes Simplex Virus type 2 among persons attending sexually transmitted disease // Sex. Transm. Dis. — 2001. — V. 28, N 2. — P. 99–104.



ПАРАМЕТРИ СПЕЦИФІЧНОЇ ВЗАЄМОДІЇ  
СИРОВАТКОВИХ АНТИТІЛ  
З РЕКОМБІНАНТНИМ АНАЛОГОМ  
ГЛІКОПРОТЕЇНУ G  
ВІРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ 2-ГО ТИПУ

THE SPECIFIC INTERACTION  
PARAMETERS OF SERUM ANTIBODIES  
WITH A RECOMBINANT ANALOGUE  
OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2,  
GLYCOPROTEIN G

Л. М. Коршун<sup>1</sup>  
Г. В. Ковтонюк<sup>1</sup>  
Л. М. Мойса<sup>1</sup>  
О. К. Кисельова<sup>1</sup>  
Л. О. Ганова<sup>1,2</sup>  
М. І. Вудмаска<sup>1</sup>  
М. Я. Співак<sup>2</sup>

L. M. Korshun<sup>1</sup>  
G. V. Kovtonjuk<sup>1</sup>  
L. M. Moysa<sup>1</sup>  
O. K. Kiselyova<sup>1</sup>  
L. O. Ganova<sup>1,2</sup>  
M. I. Vudmaska<sup>1</sup>  
M. J. Spivak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НВК «Діапроф-Мед», Київ

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології  
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: KL2004@ukr.net

<sup>1</sup>JSC «Diaproph-Med», Kyiv

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology  
and Virology of National Academy of Sciences  
of Ukraine, Kyiv

E-mail: KL2004@ukr.net

Визначали параметри специфічної взаємодії, такі як афінність та авідність, сироваткових IgG у процесі формування імунокомплексу з рекомбінантним антигеном вірусу простого герпесу 2-го типу.

У ході проведених досліджень було встановлено, що всі позитивні до цього вірусу сироватки містять високоафінні антитіла (показник ступеня константи афінності знаходився у діапазоні  $10^7$ – $10^8$  M<sup>-1</sup>). Найбільше значення індексу авідності (81,15±11,15)% спостерігали в антитіл сироватки № 2, а у зразків № 1 та № 3 ці значення були нижчими: (62,50±15,50)% та (65,0±15,10)%, відповідно, хоча достовірна різниця між ними була відсутня ( $P > 0,05$ ). Отримані результати оцінки авідності цих сироваток добре узгоджувались із теоретичними значеннями констант афінності, які визначали у форматі непрямого імуноензимного аналізу згідно з методом Фріге та ін. з використанням рівнянь Скетчарда, Клотца, а також рівняння Стівенса.

Для однієї із сироваток (№4) встановлено розбіжність між величиною афінності та рівнем авідності антитіл. Так, значення константи афінності, розраховане за допомогою рівняння Стівенса, становило  $(2,08 \pm 0,25) \cdot 10^8$  M<sup>-1</sup>, при цьому індекс авідності імуноглобулінів (23,50±6,50)% був достовірно нижчим ( $P < 0,05$ ) порівняно з високоавідними сироватками.

Одержані результати є вагомим внеском в удосконалення існуючих методів лабораторної діагностики вірусу простого герпесу, а також виявлення вірусспецифічних антитіл у сироватці крові.

**Ключові слова:** вірус простого герпесу 2-го типу, імуноензимний аналіз, константа афінності, авідність антитіл.

Specific interaction parameters such as affinity and avidity of serum IgG in the formation of immunocomplex with recombinant antigen of herpes simplex virus type 2 were determined.

It was found that all the herpes simplex virus type 2 positive sera contained high-affinity antibodies (the exponent of the affinity constant was in the range  $10^7$ – $10^8$  M<sup>-1</sup>). The highest value of avidity index (81,15±11,15)% was observed in serum antibody number 2 while for the samples number 1 and number 3 these values were lower: (62,50±15,50)% and (65,0±15,10%) respectively, although there was not significant difference between the amples ( $P > 0,05$ ). The results of the avidity estimation for these three sera were in good agreement with theoretical values of affinity constants which were measured by the indirect ELISA according to the method of Freguet and others using the equations of Scatchard, Klotz and the equation of Stevens.

For one of the sera (№ 4) it was found the discrepancy between the affinity and avidity of antibody levels. Thus the affinity constant value calculated with the equation of Stevens was  $(2,08 \pm 0,25) \cdot 10^8$  M<sup>-1</sup> and the avidity index (23,50 ± 6,50)% was significantly lower ( $P < 0,05$ ) with respect to these three serums.

Obtained results are a contribution to the improvement of existing methods of laboratory diagnosis of herpes simplex virus and the detection of virus-specific antibodies in serum.

**Key words:** herpes simplex virus type 2, enzyme-linked immunosorbent assay, affinity constant, avidity of antibodies.