

Влияние различных факторов на трансформацию сывороточных иммуноглобулинов в полиреактивные иммуноглобулины и на взаимодействие последних с антигенами

С. А. Бобровник, Н. Е. Черная, И. В. Николаенко

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
Ул. Леонтовича, 9, Киев, 252, Украина

Найдены оптимальные условия для процесса усиления активности сывороточных полиреактивных иммуноглобулинов (ПРИГ) с помощью резкого сдвига pH или их обработки хаотропными ионами. Выявлена значительная зависимость этого процесса от температуры инкубационной среды. Исследовано влияние pH и концентрации некоторых солей на связывание ПРИГ иммуноглобулинов с иммобилизованными на платах антигенами. Полученные данные свидетельствуют о том, что электростатические силы играют важную роль во взаимодействии ПРИГ с антигенами. Показано также, что не только сывороточные иммуноглобулины, но и высокоспецифические моноклональные антитела в результате их обработки буферами с низкими или высокими значениями pH или же хаотропными ионами могут быть трансформированы в ПРИГ.

Введение. Ранее нами было установлено, что инкубация сывороточных иммуноглобулинов в растворах с низкими значениями pH или высокими концентрациями хаотропных ионов приводит к заметному усилению полиреактивных свойств этих иммуноглобулинов, т. е. к способности взаимодействовать с различными по структуре антигенами [1, 2]. Позднее было показано, что обнаруженное нами усиление полиреактивных свойств иммуноглобулинов связано не только с разблокированием предсуществовавших заблокированных полиреактивных иммуноглобулинов (ПРИГ), но и с изменением конформации по крайней мере части иммуноглобулинов [3]. Результатом этих конформационных изменений является, по-видимому, увеличение пластичности связывающих центров антител, в результате чего они приобретают способность (благодаря высокой пластичности их конформации) становиться комплементарными структуре различных антигенов и, как следствие, взаимодействовать с ними. Было также показано, что некоторые

высокоспецифические моноклональные антитела (МАТ) также способны трансформироваться в ПРИГ под влиянием указанных физико-химических факторов [4]. Таким образом, способность трансформироваться в ПРИГ при определенных условиях является пока что мало изученным свойством по крайней мере части сывороточных иммуноглобулинов и МАТ. Поэтому одной из задач настоящей работы было более детальное исследование условий, при которых сывороточные иммуноглобулины приобретают свойства ПРИГ.

Согласно данным литературы [5, 6], взаимодействие моноклональных ПРИГ с антигенами по многим параметрам отличается от взаимодействия моноспецифических антител. Наши предварительные данные [7] также свидетельствуют о том, что ПРИГ, полученные в результате разблокирования и/или трансформации сывороточных иммуноглобулинов с помощью хаотропных ионов, взаимодействуют с антигеном иначе, чем специфические антитела. В связи с этим еще одной задачей настоящего исследования было изучение влияния различных условий на взаимодействие этих ПРИГ с иммобилизованными на платах антигенами.

Материалы и методы. В качестве антигенов в работе использовали овальбумин (Олайна, Латвия); лизоцим («Reanal», Венгрия); гемоцианин улитки и бычий сывороточный альбумин (БСА) («Sigma», США); очищенный дериват туберкулина (ПД) (Курская биофабрика, Россия); казеин молока коровы и соевый ингибитор трипсина (Олайн), а также вакцинный вирус полиомиелита II типа — штамм P712 CH2ab, полученный по методу [8].

Антигены иммобилизовали в лунках 96-ячеечных полистироловых плат методом высушивания их растворов в бикарбонате аммония, как описано ранее [9]. Количество ПРИГ, связавшихся с иммобилизованным на платах антигеном, определяли методом ELISA, используя меченные пероксидазой хрена коммерческие антииммуноглобулиновые сыворотки. В качестве субстрата пероксидазы использовали смесь *орто*-фенилендиамина и 0,015 % H_2O_2 , реакцию останавливали 4 М H_2SO_4 . Интенсивность окраски измеряли при 490 нм на автоматическом микрокалориметре («Dynatech»,).

Использовавшиеся в работе специфические к БСА МАТ В2901 являлись коммерческим продуктом фирмы «Sigma», а специфические к вакцинному вирусу полиомиелита I типа P712 CH2ab МАТ 8В11 (изотип антител IgG2a) получены по [8].

Иммуноглобулины сыворотки кроля выделяли с помощью 4-кратного высаливания 40 % $(NH_4)_2SO_4$, как описано [10]. После осаждения центрифугированием иммуноглобулины растворяли в исходном объеме 0,15 М NaCl и диализовали против 0,15 М NaCl при 4 °С в течение ночи.

Количество белка в исследуемых препаратах определяли спектрофотометрически по Бредфорду [11], используя овальбумин как стандарт.

Смесь для трансформации иммуноглобулинов сыворотки человека и животных в ПРИГ готовили, смешивая 1:1 сыворотку с 7-8 М KSCN. Через 10 мин инкубации при комнатной температуре смесь разводили 1:100 в 0,15 М NaCl и раститровывали в 0,05 М фосфатном буфере (pH 5,0) + 0,05 % Твин-20 ТФБ (pH 5,0) до 1:1000—1:100000 и вносили в 96-ячеечные платы с иммобилизованными антигенами.

Для изучения возможности трансформации сывороточных иммуноглобулинов в ПРИГ с использованием низких или высоких значений pH сыворотку или сывороточные иммуноглобулины в объеме 0,02 мл, выделенных с помощью высаливания 40 % $(NH_4)_2SO_4$, добавляли к 10 мл 0,2 М KCl-HCl-буфера с различными значениями pH (1,5—2,8 или 11,0—13,0). Через 5 мин инкубации при комнатной температуре величину pH каждого образца

доводили до 5,0 с помощью 4 М NaOH или 8 М HCl, а затем раститровывали в ТФБ (pH 5,0) и методом ELISA исследовали способность полученных таким образом ПРИГ взаимодействовать с иммобилизованными антигенами.

Результаты и обсуждение. Поскольку появление полиреактивных свойств у иммуноглобулинов, согласно нашим данным [3], связано, по крайней мере частично, с изменением их конформации, можно было ожидать, что этот процесс в значительной степени зависит от температуры, так как конформационные изменения имеют, как правило, высокую энергию активации [12]. В связи с этим мы исследовали влияние температуры на величину оптимальной концентрации KSCN, способной максимально усилить полиреактивные свойства сывороточных иммуноглобулинов кролика (рис. 1).

Как видно из рис. 1, иммуноглобулины интактной сыворотки способны с незначительной эффективностью связываться с антигенами, по-видимому, за счет наличия в них «естественных» ПРИГ, существование которых в сыворотках человека и животных было доказано многими работами [13—15]. Однако после инкубации с KSCN способность иммуноглобулинов взаимодействовать с антигенами многократно возрастает. При этом при температуре 0 °С максимальную активность ПРИГ индуцировали более высокие концентрации KSCN (около 6,0 М), чем при 27 °С (около 5,0 М) или 37 °С (около 4,0 М) (рис. 1). Следует также отметить, что инкубация иммуноглобулинов в 4,0 М растворе KSCN при 37 °С более эффективна, чем инкубация при 27 или 0 °С в растворах KSCN соответствующей оптимальной концентрации. Дальнейшее увеличение концентрации KSCN (сверх оптимальной) приводит к снижению активности ПРИГ, по-видимому, вследствие необратимой денатурации части молекул.

Сходные результаты были получены нами и при изучении зависимости трансформации сывороточных иммуноглобулинов от температуры и резкого сдвига pH (рис. 2, 3). Обнаружено, что кратковременная инкубация (5—10 мин) сыворотки при низких значениях pH также значительно усиливает взаимодействие иммуноглобулинов с антигенами, очевидно, как за счет разблокирования уже имеющихся в сыворотке ПРИГ, так и за счет трансформации части сывороточных иммуноглобулинов в ПРИГ. Оптимальным значением pH (в области низких значений) для разблокирования и/или трансформации иммуноглобулинов в ПРИГ было pH 1,8—2,0, тогда как более высокие величины (pH 2,2—3,0) обладали меньшей эффективностью. Снижение pH инкубационной среды ниже

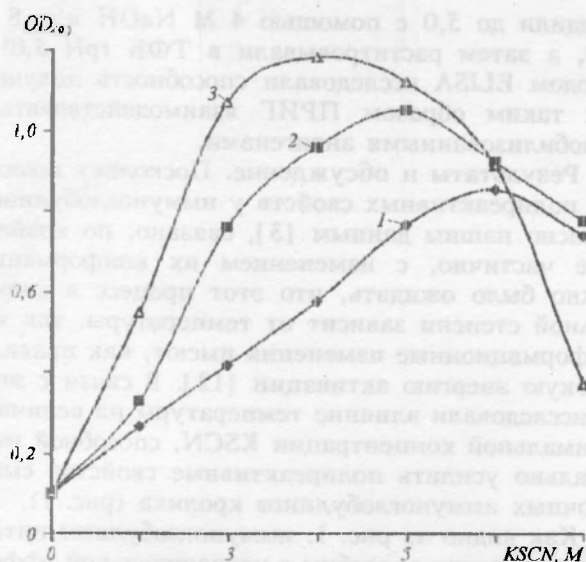


Рис. 1. Влияние предварительной инкубации иммуноглобулинов сыворотки кролика при различных концентрациях KSCN и температурах на способность этих иммуноглобулинов взаимодействовать с иммобилизованным на платах овальбумином: 1 — 0; 2 — 27; 3 — 37 °С. Здесь и на рис. 2 — OD_{490} — оптическая плотность, пропорциональная количеству иммуноглобулинов, связавшихся с антигеном

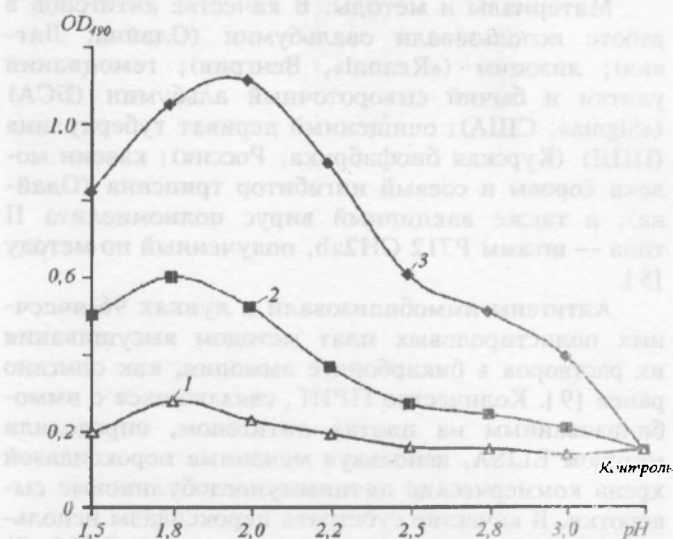


Рис. 2. Влияние низких значений pH и температуры предварительной инкубации иммуноглобулинов сыворотки кролика на их способность взаимодействовать с иммобилизованным на платах овальбумином: 1 — 0; 2 — 27; 3 — 37 °С. Здесь и на рис. 3 указано значение pH буфера, в котором инкубировали иммуноглобулины перед их внесением (при pH 5,0) в платы с иммобилизованным антигеном

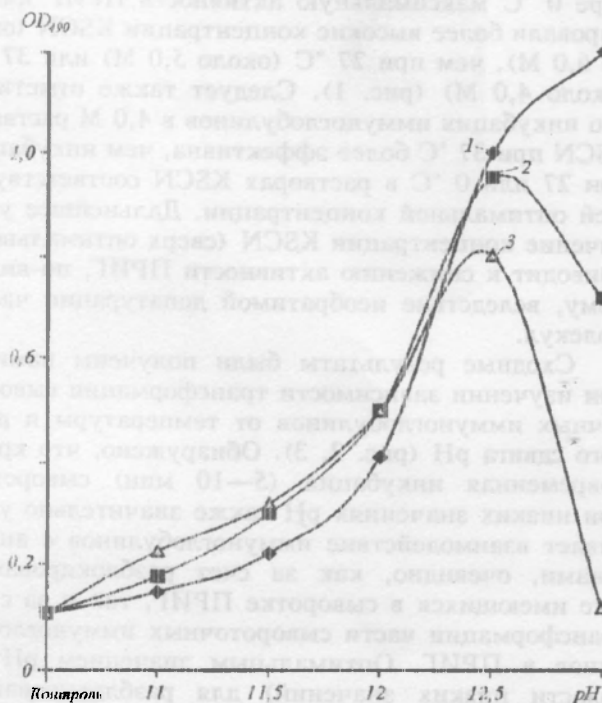


Рис. 3. Влияние высоких значений pH и температуры предварительной инкубации иммуноглобулинов сыворотки кролика на их способность взаимодействовать с иммобилизованным на платах овальбумином: 1 — 0; 2 — 27; 3 — 37 °С

оптимальных значений (до 1,5 и ниже) вызывало падение активности ПРИГ, очевидно, вследствие необратимой денатурации части молекул, в результате чего они или теряют способность связываться с антигенами, или не распознаются антииммуноглобулиновыми сыворотками. Отметим также, что процесс повышения активности сывороточных ПРИГ под влиянием низких значений pH в значительной степени зависит от температуры инкубации. Повышение температуры от 0 до 37 °С резко усиливало эффективность этого процесса (рис. 2). При этом более эффективным индуктором данного процесса, чем инкубация при низких pH, являлась инкубация иммуноглобулинов в 4 М растворе KSCN, которая при 20 °С была в 1,5—2 раза эффективнее по сравнению с инкубацией при pH 2,0 и 37 °С.

Инкубация иммуноглобулинов при высоких значениях pH (12,0—13,0) способна индуцировать выраженные полиреактивные свойства иммуноглобулинов даже более эффективно, чем KSCN (рис. 3). Этот процесс зависит и от температуры, причем максимальная активность ПРИГ наблюдалась после инкубации иммуноглобулинов при pH 13,0 и температуре 0 °С, тогда как при 37 °С оптималь-

ным было рН 12,5, что связано, по-видимому, с инактивацией значительной части иммуноглобулинов при рН 13,0 и 37 °С.

В связи с вышеизложенным необходимо отметить следующее. Поскольку высокие концентрации хаотропных ионов, а также низкие и высокие значения рН, как известно, индуцируют диссоциацию комплексов антиген—антитело [16], наблюдаемое нами повышение активности ПРИГ вследствие подобных воздействий, по-видимому, частично связано с разблокированием присутствующих в сыворотке ПРИГ, заблокированных сывороточными антигенами. Данные о том, что сывороточные ПРИГ могут быть заблокированы тем или иным путем, были опубликованы ранее [15, 17]. Тем не менее, согласно нашим данным [3, 4], усиление активности ПРИГ, наблюдаемое после обработки сывороток KSCN или буферами с низкими или высокими значениями рН, связано не только с их разблокированием, но, по-видимому, и с появлением новых молекул ПРИГ благодаря изменениям структуры и свойств специфических антител, не обладавших до обработки полиреактивными свойствами.

Таким образом, нами были найдены оптимальные условия для разблокирования и/или превращения «неактивных» иммуноглобулинов сыворотки кролика в ПРИГ, которые способны взаимодействовать с разнообразными по структуре антигенами. Отметим, что сходные закономерности обнаружены нами и при использовании сывороток или их иммуноглобулиновых фракций мыши, человека и крупного рогатого скота. Поскольку сывороточные иммуноглобулины представляют собой огромное число клонов молекул, обладающих индивидуальными характеристиками, то найденные нами оптимальные условия трансформации иммуноглобулинов в ПРИГ отражают, по-видимому, тот факт, что эти условия являются достаточно жесткими для индукции как разблокирования ПРИГ, так и локальных изменений конформации антигенсвязывающих центров некоторых моноклонов иммуноглобулинов, но еще недостаточно жесткие для полной денатурации многих моноклонов.

Следующей нашей задачей был поиск оптимальных условий взаимодействия с различными антигенами кроличьих ПРИГ, полученных в результате обработки сывороточных иммуноглобулинов 4,0 М KSCN. На рис. 4 представлены результаты изучения зависимости связывания ПРИГ кролика или специфичных к овальбумину сывороточных антител с иммобилизованным на платах овальбумином от рН инкубационной среды. Отметим, что сходная зависимость связывания

ПРИГ от рН среды наблюдалась и случае использования в качестве антигенов БСА, лизоцима, ППД, казеина молока коровы, гемоцианина улитки, соевого ингибитора трипсина, а также при исследовании взаимодействия с антигенами ПРИГ человека и мыши (данные не приведены).

Как следует из рис. 4, оптимальными для взаимодействия ПРИГ с антигенами являются слабощелочные значения рН (примерно рН 5,0). Необходимо подчеркнуть, что ярко выраженная зависимость взаимодействия ПРИГ с антигенами от рН среды не связана с тем, что к ПРИГ относится какая-то особая фракция иммуноглобулинов, для которой оптимум взаимодействия с антигенами близок к рН 5,0. Это легко продемонстрировать, используя высокоспецифические МАТ. Так, к примеру, оптимум взаимодействия МАТ 8В11 с вирусом полиомиелита находится в области рН 6,5—8,5 (рис. 5). Эти антитела являются моноспецифическими и совершенно не связываются с другими антигенами (овальбумином, БСА, лизоцимом и др.) ни при каких значениях рН. Однако после обработки указанных антител 3,5 М KSCN (10 мин, 20 °С) они трансформируются в ПРИГ, которые связываются как с вирусом полиомиелита,

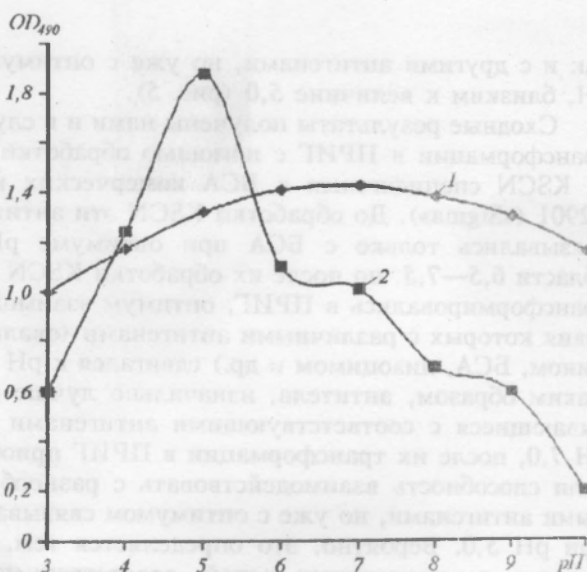


Рис. 4. Зависимость реакции связывания специфических антител и полиреактивных иммуноглобулинов сыворотки кролика с иммобилизованным овальбумином от рН инкубационной смеси: 1 — антитела; 2 — ПРИГ. Здесь и на рис. 5 — указано значение рН инкубационной среды

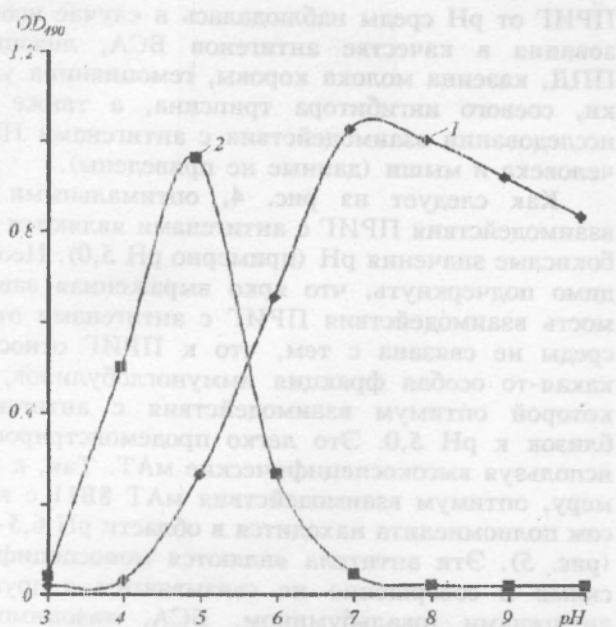


Рис. 5. Влияние pH инкубационной среды на взаимодействие моноклональных антител 8В11 с иммобилизованным вирусом полиомиелита, а также полученных из этих антител (благодаря их обработке 3,5 М KSCN) полиреактивных иммуноглобулинов с иммобилизованным овальбумином: 1 — мАТ; 2 — ПРИГ

так и с другими антигенами, но уже с оптимумом pH, близким к величине 5,0 (рис. 5).

Сходные результаты получены нами и в случае трансформации в ПРИГ с помощью обработки 3,5 М KSCN специфичных к БСА коммерческих мАТ В2901 («Sigma»). До обработки KSCN эти антитела связывались только с БСА при оптимуме pH в области 6,5—7,5, но после их обработки KSCN они трансформировались в ПРИГ, оптимум взаимодействия которых с различными антигенами (овальбумином, БСА, лизоцимом и др.) сдвигался к pH 5,0. Таким образом, антитела, изначально лучше связывающиеся с соответствующими антигенами при pH 7,0, после их трансформации в ПРИГ приобретали способность взаимодействовать с разнообразными антигенами, но уже с оптимумом связывания при pH 5,0. Вероятно, это определяется тем, что участки полипептидных цепей, ответственные за взаимодействие с антигенами, в данной области значений pH обладают как оптимальным зарядом, так и достаточной гибкостью для формирования конформаций, комплементарных структуре различных антигенов.

Известно, что pH инкубационной среды может

оказывать влияние на взаимодействие специфических антител с антигенами [18]. Это связано с тем, что в подобных взаимодействиях, как правило, участвуют силы ван-дер-Ваальса и электростатические (кулоновские) силы. Поэтому степень ионизации взаимодействующих структур, зависящая от pH среды, может существенным образом влиять на прочность связи между антигеном и антителом. Вместе с тем, по данным работы [6], взаимодействие моноклональных ПРИГ с полисахаридами или белками в значительно большей степени определяется значениями pH (в области 5,1—9,1), чем взаимодействием специфических антител с антигеном. Полученные нами результаты хорошо согласуются с этими данными литературы.

В том случае, если электростатическое взаимодействие важно для взаимодействия антиген—антитело или антиген—ПРИГ, ионная сила раствора должна также оказывать существенное влияние на такое взаимодействие. Это связано с тем, что силы притяжения между противоположно заряженными карбоксильными и аминогруппами полярных аминокислот могут быть в значительной степени экранированы ионами солей, обладающими положительными или отрицательными зарядами. Поскольку кулоновские силы играют важную роль в связывании ПРИГ с антигенами, о чем свидетельствуют приведенные выше данные о влиянии pH на эту реакцию, можно было ожидать, что взаимодействие ПРИГ с антигеном будет зависеть и от ионного состава инкубационной среды.

Так как оптимальным для взаимодействия ПРИГ с антигеном является значение pH 5,0, влияние концентрации различных солей (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4) исследовали в 0,1 М фосфатном буфере как при нейтральных значениях pH, так и при pH 5,0. Нами установлено (рис. 6), что связывание ПРИГ кролика или мыши с иммобилизованными антигенами может быть усилено благодаря использованию оптимальной концентрации таких солей, как NaCl или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Сходное с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ действие на связывание ПРИГ с антигеном оказывает Na_2SO_4 . При этом количество ПРИГ, связавшихся с иммобилизованным антигеном при определенной концентрации соли, всегда было выше при pH 5,0, чем при pH 7,2, однако эти различия были более заметными при низких концентрациях указанных солей. Полученные данные подтверждают вывод о том, что электростатические силы играют важную роль во взаимодействии ПРИГ с антигенами.

Отметим, что сделанное нами ранее [1, 2] предположение о том, что ПРИГ обладают уникальной способностью приобретать конформацию,

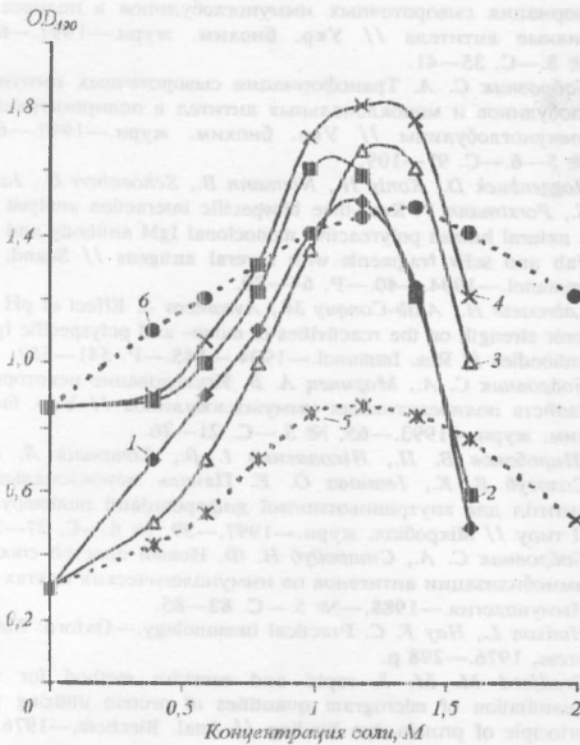


Рис. 6. Влияние различных солей на реакцию связывания полиреактивных иммуноглобулинов сыворотки кролика с иммобилизованным овальбумином при рН 5,0 (2, 6) и рН 7,2 (1, 3—5): 1 — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 — Na_2SO_4 ; 4 — Na_2SO_4 ; 5 — NaCl ; 6 — NaCl

комплементарную структуре разнообразных, не похожих друг на друга молекул, в последнее время неоднократно высказывалось и другими авторами [5, 6, 19]. Если это предположение верно, тогда различные антигены, связываясь с ПРИГ, должны быть способны частично блокировать последние, ослабляя их взаимодействие с другими серологически неродственными антигенами. Действительно, последующие экспериментальные результаты подтверждают этот вывод. На рис. 7 представлены данные о влиянии предварительной инкубации (1,5 ч при 37 °С) ПРИГ с различными концентрациями ППД, БСА, протамина и лизоцима на взаимодействие ПРИГ кролика с иммобилизованным на платах овальбумином. Эти данные свидетельствуют о том, что, несмотря на несходство выбранных антигенов, все они способны в значительной степени ослабить взаимодействие с овальбумином, причем тем эффективнее, чем выше концентрация конкурирующего антигена.

Из рис. 7 видно также, что для блокирования ПРИГ необходимо использовать относительно большие концентрации конкурирующих антигенов. Это подтверждает невысокое сродство ПРИГ по крайней мере к указанным антигенам. Действительно, константа равновесия реакции ПРИГ, полученная после трансформации сывороточных иммуноглобулинов 3,5—4,0 М KSCN , с такими антигенами, как овальбумин или соевый ингибитор трипсина, равна примерно $(2-4) \cdot 10^{-4}$ М [4], что в 10^3-10^6 раз ниже, чем константы сродства моноспецифических антител. Таким образом, можно полагать, что, приобретая полиреактивность, то есть способность связываться с различными антигенами, сывороточные антитела не только теряют свою специфичность, но и сродство подобных антител к антигенам снижается на несколько порядков.

Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что как сывороточные иммуноглобулины человека и животных, так и многие высокоспецифические моноклональные антитела при определенных условиях способны трансформироваться в ПРИГ. Взаимодействие ПРИГ с антигенами по целому ряду признаков отличается от реакции антиген—антитело, а имен-

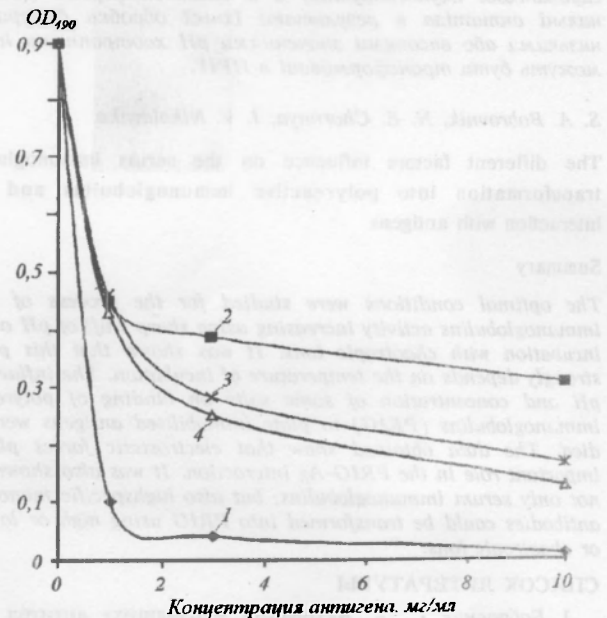


Рис. 7. Влияние предварительной инкубации полиреактивных иммуноглобулинов с ППД, БСА, протамином или лизоцимом на их взаимодействие с иммобилизованным овальбумином: 1 — ППД; 2 — БСА; 3 — лизоцим; 4 — протамин

но: существенно зависит от температуры [1], pH и солевого состава инкубационной среды. Хотя аффинность ПРИГ к антигенам на несколько порядков ниже, чем таковая специфических антител, некоторые авторы считают, что эти иммуноглобулины играют важную роль в защите организма от различных инфекций [14, 20]. Полагают также, что ПРИГ могут обладать иммунорегуляторными свойствами [14, 21, 22]. Если будут получены экспериментальные доказательства этих предположений, то они будут свидетельствовать о роли ПРИГ как необходимого звена защитного иммунитета, что, несомненно, повысит к ним интерес многих исследователей.

С. О. Бобровник, Н. Е. Чорна, І. В. Ніколаєнко

Вплив різних факторів на трансформацію сироваткових імуноглобулінів у поліреактивні імуноглобуліни та на взаємодію останніх з антигенами

Резюме

Визначено оптимальні умови для процесу підвищення активності сироваткових поліреактивних імуноглобулінів (ПРИГ) за допомогою різкого зсуву pH або їхньої обробки хаотропними іонами. Виявлено значну залежність цього процесу від температури інкубаційного середовища. Досліджено вплив pH і концентрації деяких солей на зв'язування ПРИГ з іммобілізованими на платах антигенами. Отримані дані свідчать про те, що електростатичні сили відіграють важливу роль у взаємодії ПРИГ з антигенами. Встановлено, що не лише сироваткові імуноглобуліни, а й високоспецифічні моноклональні антитіла в результаті їхньої обробки буферами з низькими або високими значеннями pH хаотропними іонами можуть бути трансформовані в ПРИГ.

S. A. Bobrovnik, N. E. Chornaya, I. V. Nikolaenko

The different factors influence on the serum immunoglobulins transformation into polyreactive immunoglobulins and their interaction with antigens

Summary

The optimal conditions were studied for the process of serum immunoglobulins activity increasing using sharp shift of pH or their incubation with chaotropic ions. It was shown that this process strongly depends on the temperature of incubation. The influence of pH and concentration of some salts on binding of polyreactive immunoglobulins (PRIG) to plate immobilised antigens were studied. The data obtained show that electrostatic forces play an important role in the PRIG-Ag interaction. It was also shown, that not only serum immunoglobulins, but also highspecific monoclonal antibodies could be transformed into PRIG using high or low pH, or chaotropic ions.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бобровник С. А. Активация «молчащих» антител и их взаимодействие с антигенами // Укр. биохим. журн.—1990.—62, № 5.—С. 86—89.
2. Бобровник С. А., Лященко К. П., Комиссаренко С. В. Полиспецифические антитела и их активации // Докл. АН УССР.—1990.—№ 6.—С. 71—74.
3. Бобровник С. А., Петрова Ю. И., Ефетов К. А. Транс-

- формация сывороточных иммуноглобулинов в полиреактивные антитела // Укр. биохим. журн.—1997.—69, № 3.—С. 35—41.
4. Бобровник С. А. Трансформация сывороточных иммуноглобулинов и моноклональных антител в полиреактивные иммуноглобулины // Укр. биохим. журн.—1997.—69, № 5—6.—С. 97—109.
5. Roggenbuck D., Konig H., Niemann B., Schoenherr G., Jahn S., Porstmann T. Real-time biospecific interaction analysis of a natural human polyreactive monoclonal IgM antibody and its Fab and scFv fragments with several antigens // Scand. J. Immunol.—1994.—40.—P. 64—70.
6. Labrousse H., Adib-Conquy M., Avrameas S. Effect of pH or ionic strength on the reactivities of mono- and polyspecific IgG antibodies // Res. Immunol.—1994.—145.—P. 541—552.
7. Бобровник С. А., Маринец А. В. Исследование некоторых свойств полиреактивных иммуноглобулинов // Укр. биохим. журн.—1993.—65, № 5.—С. 21—26.
8. Ширококов В. П., Николаенко І. В., Копаниця Л. В., Сологуб В. К., Иванова О. Е. Панель моноклональних антитіл для внутрішньотипової диференціації поліомірусів II типу // Мікробіол. журн.—1997.—59, № 6.—С. 27—36.
9. Бобровник С. А., Стародуб Н. Ф. Новый простой способ иммобилизации антигенов на иммунологических платах // Иммунология.—1988.—№ 5.—С. 83—85.
10. Hudson L., Hay F. C. Practical immunology.—Oxford: Alden press, 1976.—298 p.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72.—P. 248—254.
12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты / Пер. с англ.—М.: Мир, 1982.—Т. 1.—389 с.
13. Casali P., Notkins A. L. Probing the human B-cell repertoire with EBV: Polyreactive antibodies and CD5⁺ lymphocytes // Annu. Rev. Immunol.—1989.—7.—P. 513—535.
14. Avrameas S. Natural antibodies: from «horror autotoxicus» to «gnosthi seauton» // Immunol. Today.—1991.—12, N 5.—P. 154—159.
15. Avrameas S., Ternynk T. The natural autoantibodies system. between hypothesis and facts // Mol. Immunol.—1993.—30.—P. 1133—1142.
16. Ruoslahti E. Antigen antibody interaction, antibody affinity, and dissociation of immune complexes // Scand. J. Immunol.—1976.—3.—P. 3—7.
17. Sigounas G., Kolaitis N., Monell-Torrens E., Notkins A. L. Polyreactive IgM antibodies in the circulation are masked by antigen binding // J. Clin. Immunol.—1994.—14.—P. 375—381.
18. Absolom D. R., van Oss C. J. The nature of the antigen-antibody bond and the factors affecting its association and dissociation // Crit. Rev. Immunol.—1986.—6.—P. 1—46.
19. Padlan E. A. Anatomy of the antibody molecule // Mol. Immunol.—1994.—31.—P. 169—217.
20. Gonzales R., Matsoita P., Torchy C., De Kinkelin P., Avrameas S. Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro // Res. Immunol.—1989.—140.—P. 675—684.
21. Coutinho A. Beyond clonal selection and network // Immunol. Rev.—1989.—110.—P. 63—87.
22. Coutinho A., Avrameas S. Speculations on immunosomatics: Potential diagnostic and therapeutic value of immune homeostasis concepts // Scand. J. Immunol.—1992.—36.—P. 527—532.

УДК 612.017.1

Поступила в редакцию 02.04.98