

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ И ИХ ИЗОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ В ОТВЕТ НА ПРЕДЪЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯЛанда С.Б.¹, Кораблев П.В.², Филатов М.В.¹¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»*Орлова роща, г. Гатчина, 188300, РФ**e-mail: sergey.landa@gmail.com*²Национальный научно-исследовательский институт Центр инновационной медицины*ул. Жигиманту, 9, г. Вильнюс, ЛТ 01001, Литва**e-mail: korabliov.pavel@gmail.com*

Аннотация. В работе предложен новый подход анализа циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), образующихся в гетерогенных биологических жидкостях. Метод основан на анализе вклада иммунных комплексов в светорассеяние, регистрируемое с помощью спектрометра динамического светорассеяния с гетеродинамической схемой измерения [4]. Предлагаемый подход способен регистрировать иммунные комплексы, образующиеся при добавлении антигена в концентрации, превышающей 50 пг в мл. Увеличение размера иммунных комплексов за счет их дальнейшей агрегации с помощью антител, специфичных для различных иммуноглобулинов человека позволяет определять изотипический состав и гетерогенность комплексов.

Ключевые слова: динамическое светорассеяние, распределение частиц по размерам, циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), изотипы иммуноглобулинов.

DETERMINATION OF IMMUNE COMPLEXES AND THEIR ISOTYPE COMPOSITION IN BIOLOGICAL FLUIDS BY DYNAMIC LIGHT SCATTERING IN RESPONSE TO THE PRESENTATION OF ANTIGENES.Landa S. B.¹, Korabliov P. V.², Filatov. M. V.¹,¹B.P. Konstantinov Peterburg Nuclear Physics Institute NRC "Kurchatov Institute"*Orlova Roscha, Gatchina, Leningrad district, 188300, RF**e-mail: sergey.landa@gmail.com*²State Research Institute Centre for Innovative Medicine*Zygimantu str., 9, Vilnius, LT 01001, Lithuania**e-mail: korabliov.pavel@gmail.com*

Abstract. In this paper we propose a new approach analysis of circulating immune complexes (CIC) formed in heterogeneous biological fluids. The method is based on an analysis of the contribution of immune complexes in light scattering that is logged by using dynamic light scattering spectrometer with heterodyne measurement scheme [12]. The proposed approach is capable of detecting immune complexes formed by the addition of the antigen in a concentration greater than 50 pg per ml. Increased immune complexes due to their size further aggregation using antibodies specific for the various human immunoglobulin isotype allows to determine the heterogeneity of the composition and complexes.

Key words: Dynamic light scattering, particle size distribution, circulating immune complexes, immunoglobulin isotypes.

Многочисленные аллергические, аутоиммунные и инфекционные заболевания, сопровождаются появлением циркулирующих в плазме крови иммунных комплексов (ЦИК). Данные об их концентрации могут служить основой для прогноза развития патологии [1]. ЦИК, или комплексы антиген-антитело – макромолекулярные структуры, образующиеся в результате специфического взаимодействия антигенов с бивалентными и мультивалентными антителами. При их эквивалентных соотношениях или при умеренном избытке антигена формируются крупные молекулярные образования, состоящие из множества частиц антигена и молекул антител. Образование и удаление ЦИК представляет собой естественную часть иммунного ответа, обеспечивающее защитные потребности организма. В тоже время, образование ЦИК может приводить к развитию патологических анафилактических реакций [1]. Выявление ЦИК, и идентификация антигенов в их составе – является актуальной проблемой, решение которой в дальнейшем будет способствовать развитию диагностических подходов и выработке стратегий лечения инфекций, аллергических и аутоиммунных и заболеваний.

Существует значительное разнообразие методов регистрации иммунных комплексов, возникающих в плазме крови и других биологических жидкостях. Недостатком данных методов являются значительная сложность в исполнении и большое количество преаналитических этапов, большое разнообразие и высокая стоимость расходных материалов, надежность анализа. Поэтому, ВОЗ рекомендует использовать не менее двух тестов, которые основаны на различных иммунологических свойствах ЦИК [2]. К сожалению, все эти методы предполагают разделение макромолекулярных систем на компоненты. Необходимы поиски альтернативных путей исследования биологических агрегатов, позволяющих изучать структурно-функциональные особенности организации нативных комплексов.

Нам представляется, что наиболее перспективным методом для решения таких задач является метод динамического светорассеяния (ДСР), [3] позволяющий без внесения внешних возмущающих воздействий

получать информацию о распределении частиц по размерам в полидисперсных растворах, каковыми и являются биологические жидкости [4]. Уникальность метода ДСР заключается в том, что он может регистрировать образование макромолекулярных комплексов в сложных биологических системах, не прибегая к фракционированию или каким-либо другим процедурам, нарушающим нативные условия, в которых происходит комплексообразование и, таким образом, получать более достоверную информацию. Радикальное увеличение светорассеяния с увеличением линейных размеров макромолекулярных образований в сочетании с возможностью оценивать их реальные размеры, позволяет регистрировать и идентифицировать образование комплексов различными компонентами биологических жидкостей, даже когда возникающее их количество очень невелико. Ранее нами было показано, что обычно размер иммунных комплексов колеблется в среднем от 100 до 300 нм [6]. Более крупные комплексы размером до 1000 нм можно получить, используя специальные подходы. Более подробно на этом вопросе мы остановимся ниже.

В данной работе мы попытаемся продемонстрировать возможности ДСР для идентификации иммунных комплексов в плазме периферической крови.

Материалы и методы. Применяемые антигены. В качестве антигенов в данном исследовании мы применяли как стандартные аллергены производства ФГУП НПО «Микроген», Россия с исходной концентрацией 10000 PNU, чистые химические соединения (Например циклоциструлин) в конечной концентрации 1 мкг/мл, так и антигены собственного производства.

Подготовка образцов крови для анализа методом ДСР. Для исследования использовали плазму крови, полученную в течение предшествующих суток путем стандартного взятия венозной крови у доноров. Забор крови проводили строго натощак. Получение плазмы крови осуществляли общепринятым методом [5]. В качестве антикоагулянта использовался гепарин в конечной концентрации 50 ед. на мл.

Плазма получалась путем удаления форменных элементов крови центрифугированием при 1500G в течение 15 мин. Супернатант отбирали и для осаждения тромбоцитов и продуктов распада клеточных элементов 1 мл центрифугировали 30 мин при 12000g. Затем образец разбавляли в 3 раз стандартным изотоничным фосфатным буфером (рН 7,2) с ионной силой, соответствующей ионной силе физиологического раствора (150 мМ NaCl), содержащим 10мМ ЭДТА. Непосредственно перед проведением измерений образцы фильтровали сначала через 0.22 μ M PVDF фильтр (Ref. № Millex-GV SLGV013SL) для префильтрации, а затем через 0.10 μ M Omnipore JV фильтр (Ref. № Millipore JVWP 01300).

Отфильтрованный образец делили на аликвоты объемом 0.18 мл по количеству исследуемых антигенов + 1 аликвота (без добавления антигена) в качестве контроля. К исследуемым аликвотам добавляли по 200 PNU мл антигена, тщательно перемешивали, и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре.

Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре – «ПЛСС» производства «ООО ИНТОКС МЕД» (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие МЗ РФ № РЗН 2014/1650 от 09 июня 2014 г.). Измерения и расчет размеров частиц в образцах биологических жидкостей проводили согласно методикам и программным продуктам, описанным ранее [7]. Результат измерений представляется в виде гистограммы распределения частиц по размерам (PSD) в которой ось абсцисс – шкала размеров в нанометрах, а по оси ординат отложен вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. При этом суммарное рассеяние всех частиц образца принимается за 100%. Для каждого образца измерения проводили не менее 3 раз, и данные, полученные в результате регуляризации усредняли. Это позволило получить среднее и дисперсию размера и вклада в рассеяние для каждой фракции частиц, имеющих в измеряемом образце. О положительной реакции на антиген свидетельствовало отсутствие в исходной плазме частиц с Rh крупнее 100 нм, и появление таких частиц после воздействия антигена.

Результаты и обсуждение. Как показали наши предыдущие исследования гидродинамический радиус ИК лежит в диапазоне 100- 250 нм. [6]. Частицы такого размера легко могут быть зарегистрированы в плазме крови методом ДСР. Концентрационная чувствительность метода составляла порядка 50 пг антигена/мл. Такого типа частицы могут быть удалены фильтрованием через фильтр с размером пор 100 нм, например 0.10 мкМ Omnipore JV.

Если к фильтрованной плазме, в которой содержатся связывающие какой-либо антиген антитела, добавить небольшое количество данного антигена, то de novo произойдет образование ЦИК, содержащих данный антиген, и специфичные к нему иммуноглобулины. При этом, если молекулярный вес этого агента и его количество невысоки, то вносимый им самим вклад в динамическое рассеяние образцов плазмы крови будет пренебрежимо мал по сравнению с вкладом остальных частиц плазмы и никак не скажется на полученной гистограмме. Наиболее убедительно данное утверждение может быть проиллюстрировано на примере аллергической реакции организма на природные аллергены: пищевые, растительные, бытовые и т. д. Подобные реакции на уровне организма вызывают ряд широко известных симптомов, при наличии которых пациенту ставится диагноз аллергии на тот или иной антиген. Чаще всего для этого используется кожный скарификационный тест и определение титра свободно циркулирующего иммуноглобулина Е в плазме крови. С помощью динамического светорассеяния мы определили содержание ИК в плазме ряда пациентов с ярко выраженной аллергической реакцией на различные аллергены. Наиболее яркий пример описан ниже:

Пациент Б. 52 года. Диагноз аллергический риноконъюнктивит средней тяжести. Симптомы: отек слизистой носа, кашель, зуд. Скарификационный тест со стандартным аллергеном домашней пыли – положительный. Общий IgE – 560 кЕ/л.

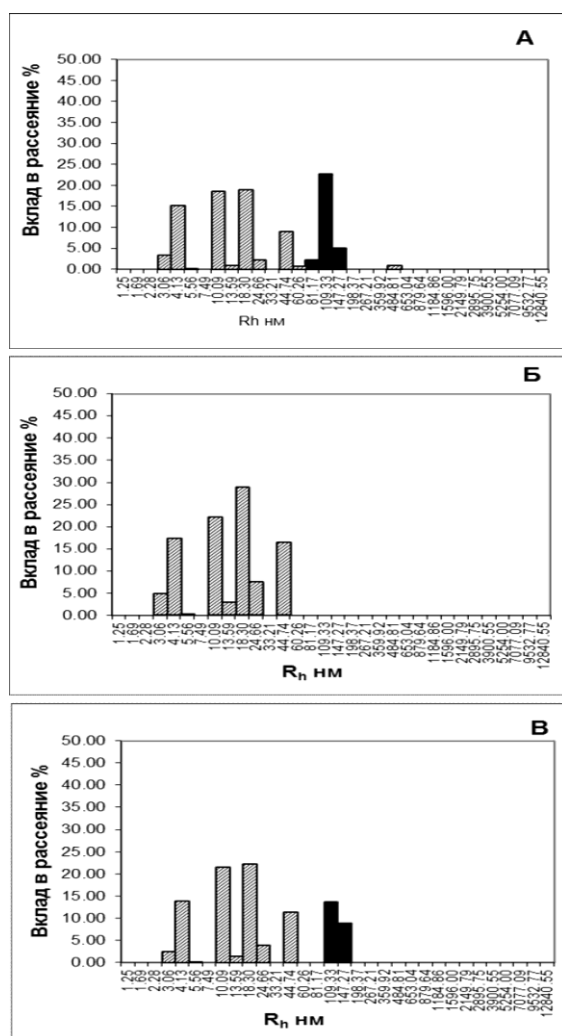


Рисунок 1 – Гистограммы распределения частиц по размерам исходной плазмы (А), плазмы, фильтрованной через фильтр 0.10 μm Omnipore JV с диаметром пор 100 нм, (Б) и фильтрованной плазмы после добавления стандартного аллергена домашней пыли. По оси X – гидродинамический радиус частиц в нм, по оси Y – вклад в рассеяние в %.

Перед исследованием плазму крови пациента разводили в 3 раза изотоническим фосфатным буфером рН 7,2 с добавлением натриевой соли ЭДТА (10 мМ) и фильтровали через фильтр 0.10 мкМ Omnipore JV с диаметром пор 100 нм. Данная процедура позволяла убрать все частицы с R_h более 50 нм, в том числе и крупные иммунные комплексы. Измерения проводили по стандартной процедуре. Как видно рисунка 1Б на котором приведены гистограммы распределения частиц по размерам (PSD) число таких частиц падает с 30 % в исходном образце плазмы (черная окраска пика на рис. 1 А) до нуля (СМ. Рис 1 Б). Добавление к 0.2 мл образца 200 единиц PNU стандартного аллергена домашней пыли вызывает образование крупных иммунных комплексов с R_h более 100 нм (черная окраска пика), вклад в рассеяние которых составляет более 20 %. (см. рис 1 В). На данном основании может быть подтверждено наличие у пациента аллергии на домашнюю пыль.

Приведенный пример не является единственным. Мы провели исследования образования ЦИК у 25 человек, 15 из которых страдают тем или иным видом аллергии, а у 10 в анамнезе отсутствует диагноз аллергии. Мы исследовали процесс образования ЦИК в плазме крови данных пациентов на 4 пищевых, 2 растительных и 5 бытовых аллергенов.

У пациентов а выраженной аллергией наблюдается образование иммунных комплексов в ответ на действие одного или нескольких исследованных аллергенов. Выраженность реакции организма пациента на тот или иной аллерген может сильно варьировать. Эмпирически мы определяем реакцию как выраженную, когда вклад в рассеяние данных частиц превышает 5 %. Отрицательная реакция на аллерген – полное отсутствие образования ИК при добавлении в плазму аллергена (вклад в рассеяние 0 %). В случае если вклад в рассеяние ИК составляет менее 5% (но не 0 %) реакция считается слабой. Практически у всех пациентов с аллергическими расстройствами имелся как минимум один аллерген, вызывающий выраженную реакцию. В тоже время у условно здоровых людей реакции образования иммунных комплексов на все исследованные аллергены

никогда не наблюдается (даже слабой). Таким образом, мы показали, что метод динамического светорассеяния может быть использован для диагностики аллергий и скрининга наиболее значимых для данного пациента аллергенов.

Еще один момент, на который хотелось бы обратить внимание, это возможность детекции, так называемых тканевых антигенов, то есть человеческих белков, которые иммунная система по той или иной причине перестала воспринимать как «свои». Это нарушения является основной причиной всех аутоиммунных заболеваний. Если в крови пациента имеются иммуноглобулины специфичные к человеческим белкам, то при добавлении маркерного тканевого антигена к такой плазме в ней будут *de novo* образовываться иммунные комплексы, которые могут быть зарегистрированы методом динамического светорассеяния.

В тех случаях, когда для конкретного заболевания известен маркерный антиген, как в случае ревматоидного артрита – циклоцитрулин он с успехом может быть использован в качестве маркера. Данное положение иллюстрируется следующим примером. Пациент К 49 лет. Диагноз – ревматоидный артрит. Целью исследования было зафиксировать изменения в изотипическом составе ИК на фоне проведения терапевтического лечения. В качестве стандартного антигена использовали раствор циклоцитрулина в конечной концентрации 1 мкг/мл. Образцы плазмы готовили как описано в примере 2 с тем отличием, что кроме циклоцитрулина к образцам добавляли по 20 мкл моноклональных антител к человеческим иммуноглобулинам различных изотипов, как в чистом виде, так и в различных сочетаниях. В данном случае, в образцы фильтрованной плазмы с циклоцитрулином добавляли антитела к иммуноглобулинам IgG1, IgG3, IgG4, IgE и смеси антител к IgG1 и антител к IgG3, антител к IgG1 и антител к IgE, антител к IgG3 и антител к IgE.

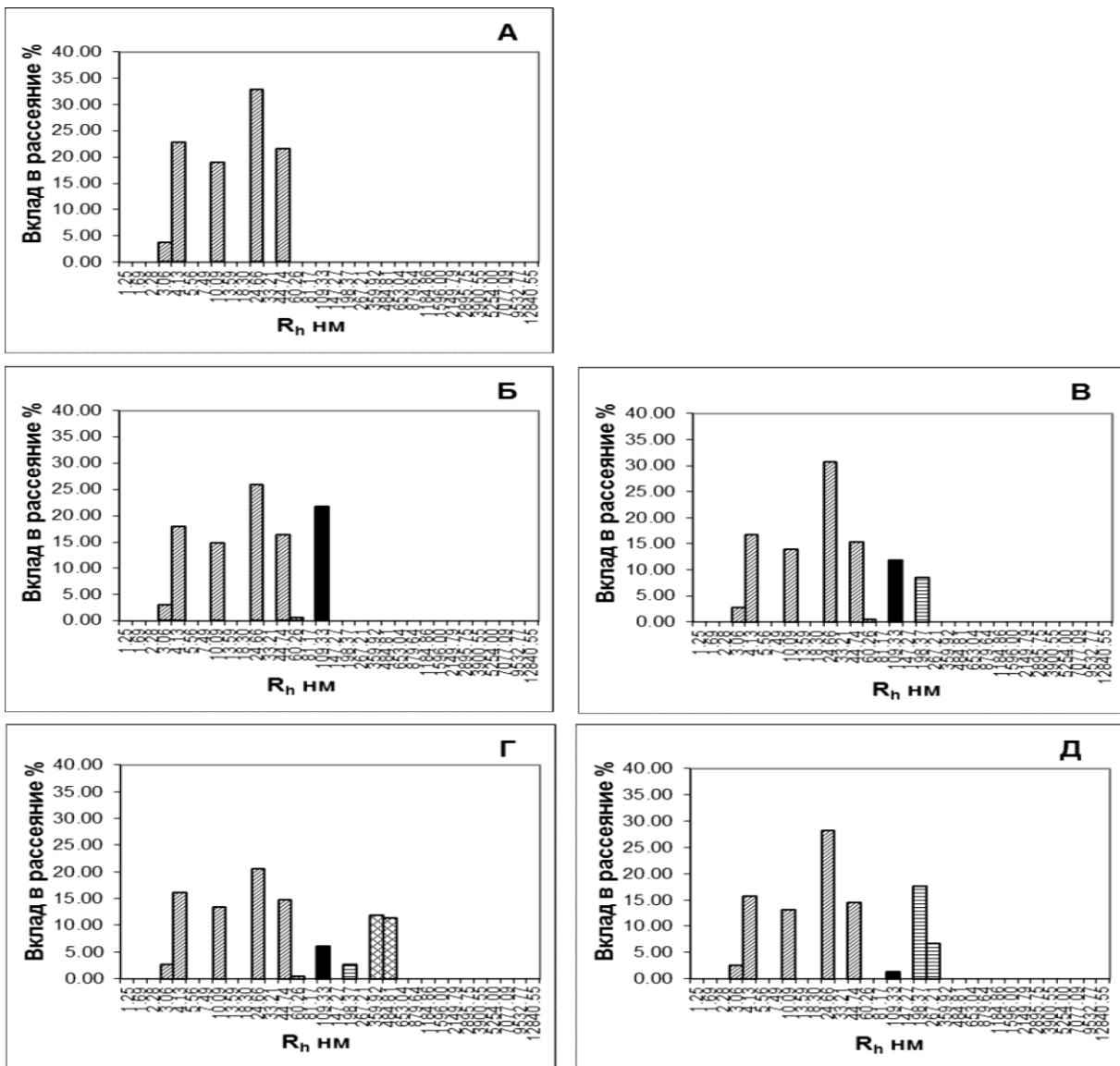


Рисунок 2 – Гистограммы распределения частиц по размерам фильтрованной плазмы (А), той же плазмы после добавления циклоцитрулина (Б), циклоцитрулина и антителами к IgG3 (В), циклоцитрулина и смеси антител а IgG1 и IgG3 (Г) и циклоцитрулина и смеси антител а IgG3 и IgE (Д). По оси X – гидродинамический радиус частиц в нм, по оси Y – вклад в рассеяние в %.

На рисунке 2 выборочно представлены только наиболее характерные варианты распределения частиц по размерам. Как видно из приведенных распределений в фильтрованной плазме пациента отсутствуют частицы с R_h более 50 нм (см. рис. 2А). После добавления к данной плазме циклоцитрулина происходит образование иммунных комплексов, о чем свидетельствует появление пика на гистограмме с R_h порядка 100 нм (рис. 2Б пик обозначен черным цветом). Если образовавшиеся иммунные комплексы содержат иммуноглобулины интересующего нас изотипа, (в данном конкретном случае IgG3, см. рис. 2В) на гистограмме появляется еще один пик с большим R_h , порядка 200 нм (горизонтальная штриховка пика). Вклад данных частиц в рассеяние позволяет примерно оценить долю иммуноглобулинов данного изотипа в общем пуле иммуноглобулинов. Однако, эта оценка не может быть строго количественной в силу сильной нелинейности вклада в рассеяние частиц от их размера. В случае использования смесей антител к различным иммуноглобулинам картина носит еще более сложный характер. Если иммунные комплексы гомогенны по своему составу, при добавлении смеси антител мы будем иметь картину, сходную с описанной выше (см. рис. 2Д) Отличия от гистограммы на рисунке 2В заключаются в заметно большем вкладе в рассеяние крупных агрегатов, так как они образуются из иммунных комплексов, содержащих иммуноглобулины обоих изотипов. Если иммунные комплексы гетерогенны, и содержат иммуноглобулины обоих изотипов, происходит образование еще более крупных мегаагрегатов с R_h порядка 400 нм (см. рис. 2Г) (крестообразная штриховка пика). В силу упомянутой выше нелинейности зависимости вклада в рассеяние от размера частиц, в данном случае мы можем только зафиксировать гетерогенность комплексов, но не можем ничего сказать о доле таких гетерогенных ИК в общем пуле. Пик с R_h порядка 100 нм в этом случае характеризует иммунные комплексы, НЕ СОДЕРЖАЩИЕ

иммуноглобулины, антитела к которым добавлены в образец. После анализа данных по всем вариантам можно сделать заключение, что в данном конкретном случае, иммуноглобулины изотипов IgG1 и IgG3 образуют гетерогенные иммунные комплексы, а иммунные комплексы, содержащие иммуноглобулин изотипа IgE – гомогенны. Содержание иммуноглобулинов остальных изотипов находится на уровне ошибки определения (вклад в рассеяние таких ЦИК менее 1 %).

Мы проследили изменение изотипического состава иммунных комплексов у данного пациента в процессе лечения, которое проводилось в клинике СПбГМУ. Результаты представлены в таблице 1. Из данных таблицы видно, что изотипический состав ИК в процессе лечения претерпевает существенные изменения: если вначале (1 срок) картина не отличается от исходной и в плазме пациента содержатся иммунные комплексы образованные исключительно иммуноглобулинами типа IgG3, То начиная со 2 срока в составе иммунных комплексов появляются иммуноглобулины типа IgE. Начиная с 3 срока, в составе иммунных комплексов появляются иммуноглобулины типа IgG1, при этом он образует гетерогенные комплексы с иммуноглобулином IgG3. Комплексы, содержащие иммуноглобулин IgE остаются однородными. На последнем сроке иммуноглобулин IgG1 становится основным в составе иммунных комплексов.

Таблица 1 – Изменение изотипического состава иммунных комплексов у пациента в процессе лечения

№	Образец	Вклад в рассеяние ИК %				
		При поступлении	1 срок	2 срок	3 срок	4 срок
1	Исходная плазма	19.8	10.1	19.4	13.8	14.5
2	Фильтрованная плазма	0	0	0	0	0
3	ЦиклоЦитрулин	9.4	5.8	13.0	11.4	7.8
4	Анти IgG1	0	0	0	4.5	7.6
5	Анти IgG2	–	–	–	–	–
6	Анти IgG3	9.3	5.6	12.2	8.6	4.2
7	Анти IgG4	0	0	0	0	0
8	Анти IgA	0	0	0	0	0
9	Анти IgE	0	0	3.4	3.6	2.8
10	Анти IgG1 + Анти IgG3	–	–	–	5.7 Мерагрр.	8.9 Мерагрр.
11	Анти IgG1 + Анти IgE	–	–	–	8.5 Агрр.	3.6 Мерагрр.
12	Анти IgG3 + Анти IgE	–	–	–	13.0 Агрр	7.7 Агрр

Приведенные данные показывают, что метод динамического рассеяния с успехом может использоваться для обнаружения и исследования изотипического состава иммунных комплексов, образующихся в плазме крови под действием различных антигенов. На основании данного метода могут быть разработаны методы диагностики различных аллергических расстройств и аутоиммунных заболеваний.

Список литературы / References:

1. Ohyama K., Ueki Y., Kawakami A., Kishikawa N., Tamai M., Osaki M., Kamihira S., Nakashima K., Kuroda N. Immune complexome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis. *J. Clin Chem.*, 2011, vol. 57, no. 6, pp. 905-599.
2. Lambert P.H., Dixon F.J., Zubler R.H., Agnello V., Cambiaso C., Casali P. [et al.] A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum. *J Clin Lab Immunol.* 1978, vol. 1, pp. 1-15.
3. Cohen R.J and Benedek G.B., Immunoassay by light scattering spectroscopy. *Immunochemistry*, 1975, vol. 12, pp. 349- 351.
4. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl Opt.*, 1997, vol. 36, pp. 7518-7522.
5. Меньшиков В.В. *Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник.* М.: Медицина, 1987, 368 с. [Menshikov V.V. *Laboratornie metody issledovaniya v klinike. Spravochnik.* Moscow: Medicina, 1987, 368 p. (In Russ.)]
6. Кораблев П.В., Ланда С. Б., Семенова Е.В., Филатов М.В. Динамическое светорассеяние – простой и чувствительный метод, позволяющий определять появление иммунных комплексов в биологических жидкостях. *Биопрепараты*, 2015, т. 54, № 2, с. 53-58. [Korabliov P.V., Landa S.B., Semionova E.V., Filatov M.V. Dynamic light scattering – a simple and sensitive method of determination immune complexes in biological liquids. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*, 2015, vol. 54, no. 2, pp. 53-58. (In Russ.)]
7. Ланда С.Б., Филатов М.В., Арутюнян А.В., Варфоломеева Е.В. Исследование образования мегамолекулярных комплексов в плазме крови методом лазерной корреляционной спектроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2008, № 4, с. 37-41. [Landa S.B., Filatov M.V., Arutiunian A.V., Varfolomeeva E.V. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy. *Klin Lab Diagn.*, 2008, no. 4, pp. 37-41 (In Russ.)]