

Динамическое светорассеяние – простой и чувствительный метод, позволяющий определять появление иммунных комплексов в биологических жидкостях

П.В. Кораблев³, С.Б. Ланда¹, Е.В. Семенова¹, М.В. Филатов^{1, 2}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова (НИЦ Курчатовский институт), Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный научно-исследовательский институт Центр инновационной медицины, Вильнюс, Литва

Dynamic light scattering – a simple and sensitive method of determination immune complexes in biological liquids

P.V. Korabliov³, S.B. Landa¹, E.V. Semionova¹, M.V. Filatov^{1, 2}

¹ B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute (NIC Kurchatov Institute), Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

³ State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Vilnius, Lithuania

В работе предложен новый подход анализа иммунных комплексов, образующихся в гетерогенных биологических жидкостях. Метод основан на анализе вклада иммунных комплексов в динамическое светорассеяние, регистрируемое с помощью лазерного коррелометра с гетеродинной схемой измерения. На модели сыворотки эмбрионов телят, к которой добавлены моноклональные антитела к церулоплазмину, продемонстрировано, что предлагаемый подход способен регистрировать иммунные комплексы, образующиеся при добавлении антигена в концентрации, превышающей 150 пг в мл. С помощью иммуноаффинных методов подтверждена правомерность идентификации пиков на гистограммах динамического светорассеяния в качестве соответствующих иммунным комплексам. Для этих целей было использовано избирательное удаление иммунных комплексов с помощью стафилококкового белка А, иммобилизованного на частицах сефарозы или увеличение размера иммунных комплексов за счет их дальнейшей агрегации с помощью антител, специфичных для иммуноглобулинов человека. Предлагаемый подход позволяет выявлять иммунные комплексы в различных биологических жидкостях.

Ключевые слова: иммунные комплексы; плазма крови; диагностический метод; динамическое светорассеяние.

Библиографическое описание: Кораблев ПВ, Ланда СБ, Семенова ЕВ, Филатов МВ. Динамическое светорассеяние – простой и чувствительный метод, позволяющий определять появление иммунных комплексов в биологических жидкостях. Биопрепараты 2015; (2): 53–58.

In this paper we introduce new approach in formed in heterogeneous biological fluids immune complexes analysis. The approach is based on an analysis of the contribution of immune complexes in dynamic light scattering, recorded by laser correlometer with heterodyne measurement circuit. We demonstrated our approach sensitivity using embryonic calf serum model in addition of monoclonal antibody against hepatocuprein. Proposed approach is capable to detect forming immune complexes by adding antigen at a concentration greater than 150 pg/ml. Using immunoaffinity techniques we confirmed the lawfulness of identified peaks in the histograms of dynamic light scattering as appropriate immune complexes. For these purposes, we selectively removed immune complexes using staphylococcal protein A sepharose immobilized on the particles or increased in size immune complexes due to their further aggregation using antibodies specific for human immunoglobulin. The proposed approach can detect immune complexes in various biological fluids.

Key words: immune complexes; blood plasma; diagnostic method; dynamic light scattering.

Bibliographic description: Korabliov PV, Landa SB, Semionova EV, Filatov MV. Dynamic light scattering – a simple and sensitive method of determination immune complexes in biological liquids. Biopreparation (Biopharmaceuticals) 2015; (2): 53–58.

Введение

Многочисленные аутоиммунные и инфекционные заболевания, в частности, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, хронический гломерулонефрит, гепатит В, СПИД, малярия, туберкулез и др., сопровождаются появлением иммунных комплексов (ИК) в плазме крови. Иммунные комплексы могут об-

наруживаться в биологических жидкостях организма и без видимых патологических изменений. Данные об их концентрации могут служить основой для прогноза развития патологии [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Кроме того, считается, что одним из блокирующих факторов защитной системы организма при возникновении злокачественных новообразований являются растворимые ИК, повы-

шенное содержание которых часто обнаруживается в крови и лимфе онкологических больных [7].

Иммунные комплексы – это гетерогенные системы, существование и функционирование которых определяются межмолекулярными взаимодействиями нековалентного характера. Образование и поддержание структурной целостности иммунных комплексов основано на сильных специфических взаимодействиях между антигенными структурами и множественными антигенсвязывающими сайтами антител различных изотипов. Дополнительная их стабилизация может осуществляться за счет межбелковых взаимодействий, преимущественно осуществляющихся посредством слабых связей, таких как ионные, дипольные, Ван-дер-Ваальсовы, водородные и гидрофобные связи.

Иммунные комплексы образуются в процессе развития гуморального иммунного ответа на различные провоцирующие факторы и могут свидетельствовать об определенных аспектах этого процесса. Состав циркулирующих ИК периферической крови человека весьма разнообразен: ИК могут содержать достаточно большое количество различных антигенов, иммуноглобулинов разных изотипов, липопротеинов, белков системы комплемента (C1, C3, C4), белков коагуляции (плазминоген, протромбин, тромбоситарный фактор 4), адгезии (изоформа 1 фибронектина, тромбоспондин 1, витронектин) и т.д. Вероятно, ИК, обнаруживаемые в крови и других биологических жидкостях (синовиальная жидкость, ликвор) доноров, отражают не только последствия развития различных заболеваний, но и индивидуальные особенности самих доноров. Появление иммунных комплексов носит защитный характер, но при определенных условиях может быть источником патологических реакций [8, 9]. Очевидно, что не только выявление ИК, но и идентификация антигенов и специфических изотипов иммуноглобулинов в их составе – актуальная проблема, решение которой в дальнейшем будет способствовать развитию диагностических подходов и выработке стратегий лечения инфекций, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также совершенствованию трансплантационной терапии. Информация о компонентах циркулирующих ИК может оказаться более значимой, чем информация о свободных антигенах и антителах.

На сегодня основными методами изучения ИК являются двумерный ЭФ и иммунологическое детектирование (Вестерн-блоттинг). Для решения этих задач также с успехом применяются комбинированные подходы, основанные на использовании двумерного ЭФ или жидкостной хроматографии высокого разрешения с последующим масс-спектрометрическим анализом [10, 9]. К сожалению, все существующие методы анализа иммунных комплексов сопряжены с их выделением из плазмы крови и других биологических жидкостей. Это приводит к тому, что анализ распределения популяции иммунных комплексов по размерам и входящим в них компонентам становится невозможным. Между тем есть основания полагать, что такого рода информация могла бы быть полезна как в диагностическом, так и в прогностическом плане. Цель данной работы состоит в том, чтобы продемонстрировать возможность регистрации интактных иммунных комплексов в биологических жидкостях с помощью динамического светорассеяния.

Одним из перспективных методов для решения таких задач нам представляется метод динамического светорассеяния (ДСР), позволяющий без внесения внешних возмущающих воздействий получать информацию о распределении частиц по размерам в полидисперсных растворах, каковыми и являются биологические жидкости [11, 12]. 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. Радиальное увеличение динамического 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.

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

Материалы и методы

Подготовка образцов крови для анализа методом ДСР

Мы исследовали плазму крови, полученную в течение предшествующих суток путем стандартного взятия венозной крови у доноров.

Для удаления антикоагулянта использовали гепарин в конечной концентрации 50 ед. на мл. Плазму получали путем удаления форменных элементов крови центрифугированием при 1500G в течение 15 мин. При приготовлении образцов для ДСР измерений плазму разбавляли в 5 раз стандартным изотоничным фосфатным буфером (pH 7,2) с ионной силой, соответствующей ионной силе физиологического раствора (150 мМ NaCl), содержащим 10 мМ ЭДТА.

Для удаления иммунных комплексов из плазмы мы использовали иммуно-аффинную седиментацию: к плазме крови добавляли избыток иммобилизованного на сефарозных шариках белка А (производство Института Пастера, Санкт-Петербург). После 10-минутной инкубации при комнатной температуре иммобилизованный белок А вместе со связавшимися с ним иммуноглобулинами удаляли центрифугированием 1000G в течение 10 мин. Супернатант, представляющий собой плазму крови, лишенную иммуноглобулинов, разбавляли фосфатным буфером.

Метод динамического светорассеяния

Метод ДСР основан на взаимодействии монохроматического когерентного излучения со светорассеивающими частицами исследуемой биологической жидкости. Информация обо всех динамических процессах в изучаемой системе содержится в спектре флуктуаций света, рассеянного на частицах в растворе. Спектр флуктуаций фототока на выходе фотоприемника совпадает со спектром рассеянного света и описывается кривой Лоренца (лоренцианом). Полуширина лоренциана прямо пропорциональна коэффициенту диффузии – D , который, в свою очередь, по формуле Эйнштейна-Стокса (1) связан с гидродинамическим радиусом частиц – R_h .

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu R} \quad (1)$$

где D – коэффициент диффузии;

k_B – постоянная Больцмана;

T – абсолютная температура;

μ – вязкость растворителя;

R – гидродинамический радиус рассеивателей.

Спектр флуктуаций фототока рассеивающих частиц разных размеров, содержащихся в полидисперсных биологических жидкостях, представляет собой сумму лоренцианов, полуширина которых характеризует гидродинамический радиус частиц, а амплитуда – вклад частиц данного размера в суммарное рассеяние образца. Решение обратной задачи методом регуляризации позволяет восстановить из спектра флуктуаций фототока гистограмму распределения по размерам частиц, вносящих вклад в светорассеяние (PSD – Particle size distribution). Такая гистограмма состоит из столбцов, высота которых отражает процентное соотношение вклада в светорассеяние компонентов анализируемой биологической жидкости. Методология предполагает, что вклад в светорассеяние остальных макромолекул и частиц считается пренебрежимо малым. Следует при этом отметить, что при физическом удалении из смеси частиц, вносящих наиболее значительный вклад в светорассеяние, вклад частиц, светорассеянием которых ранее пренебрегали, может стать значимым, что выразится в появлении на итоговой гистограмме дополнительных, ранее не видимых столбцов.

Современная измерительная техника позволяет достаточно точно измерить спектр флуктуаций интенсивности фототока в полосе частот от единиц Герц до 20–50 килоГерц, что в свою очередь позволяет оценить размеры частиц в диапазоне от единиц нанометров (2–5 нм) до десятков микрометров. Поэтому шкала размеров частиц спектрометра ДСР выбрана в диапазоне 1–10000 нм.

Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре – «ЛКС-03» фирмы «ИНТОКС». Прибор разработан и создан в Отделении молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики РАН и утвержден комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ для определения размеров микрочастиц в биологических жидкостях (Сертификат RU. С. 39.003. А № 5381).

При выборе режимов измерений (полоса спектра и количество циклов накопления) мы руководствовались соображениями о максимально достоверном восстановлении размера частиц в интересующем нас диапазоне. Измерения проводили в полосе 2048 Гц или 8096 Гц. Согласно [13], наиболее точно восстанавливаются размеры частиц, когда полоса измерений составляет не менее чем 10 полуширин лоренциана, с другой. Для частиц, размеры которых колеблются в диапазоне 0,1–1,5 мкм, полуширина лоренцианов лежит в пределах от 20 до 500 Гц, оптимальной будет полоса 8096 Гц при разрешении 4 Гц на канал (2048 точек спектра). Приведенные выше условия требуют, чтобы «негладкость» спектра составляла не более 0,03. Так как флуктуации экспериментальных точек в спектре практически всегда носят случайный характер, то можно допустить что величина «негладкости» обратно пропорциональна квадратному корню из количества копий суммарного спектра. Таким образом, количество копий накопления должно быть не менее 1000. Для исключения неизвестных факторов мы выбрали эту величину, равной 2000. При таких параметрах измерений время, затраченное на исследование одного образца, составляло около 15 минут.

Необходимо отметить, что особенность DLS подхода, использованного в данной работе и позволившего получать устойчивые результаты, связана с применением гетеродинной схемы, в отличие от гомодинной, используемой в большинстве коммерческих приборов.

Преимущества гетеродинной схемы

Повторим, что непосредственно измеряемой в данном подходе величиной является спектр (либо корреляционная функция) флуктуации фототока на выходе фоторегистрирующего прибора. Этот спектр представляет собой результат биений гармоник электромагнитных полей друг с другом и сосредоточен в низкочастотной области, т.е. там, где его очень удобно анализировать современными мощными радиотехническими методами. Уже на этом уровне, а именно на уровне классификации регистрируемых фотодетектором гармоник электромагнитных полей, возникают два варианта измерения:

1. на фотодетектор попадает лишь свет, рассеянный изучаемой системой. В этом варианте реализуется гомодинный метод измерения;
2. вместе с рассеянным на фотодетектор попадает и часть нерассеянного (опорного) излучения. Этот вариант получил название гетеродинирования.

В первом случае регистрируется лишь один – рассеянный – луч. Во второй схеме предполагается совмещение фронтов двух лучей на фотоприемнике (рассеянного и нерассеянного) [14]. Именно по первой, более упрощенной схеме, работают почти все коммерческие спектрометры ДСР.

Реализованная нами схема гетеродинирования имеет ряд преимуществ, связанных с большей, чем в гомодинной схеме, концентрационной чувствительностью и устойчивостью к присутствию посторонних сильных рассеивателей в исследуемом образце. Это позволяет избежать искажений измерений, связанных с присутствием посторонних рассеивателей [11].

Результаты исследования

Частицы размера иммунных комплексов легко могут быть зарегистрированы в плазме крови методом ДСР. Для подтверждения этого тезиса достаточно добавить небольшое количество какого-либо иммуногенного макромолекулярного агента к плазме крови, в которой содержится связывающий его антител. Если молекулярный вес этого агента и его количество невысоки, то вносимый им вклад в динамическое рассеяние образцов плазмы крови бу-

дет пренебрежимо мал и никак не скажется на полученной гистограмме. На рис. 1А приведена гистограмма распределения частиц по размерам (PSD) в цельной плазме крови человека. На рис. 1В представлена гистограмма того же образца плазмы, из которой иммуноглобулины были удалены путем сорбции на иммобилизованном белке А. Отличается данная гистограмма от предыдущей лишь отсутствием пика, с Rh около 100–150 нм, выделенного черным цветом (удалены иммунные комплексы, связанные белком А). Добавление к такой плазме малого количества мелкодисперсного хитина не приводит к изменению характера гистограммы (рис. 1В). Напротив, добавление такого же количества хитина к плазме крови, не подвергшейся обработке белком А и содержащей иммуноглобулины, вызывает радикальное изменение картины динамического светорассеяния, связанное с образованием крупных агрегатов, хорошо рассеивающих свет (пик черного цвета на рис. 1Г). Антитела к таким часто встречающимся в инфекционных агентах молекулам, как хитин имеются в крови практически всех здоровых людей, образуясь в результате иммунного ответа на компоненты флоры кишечника. Однако содержание этих антител в крови различных доноров может существенно различаться. Это несколько затрудняет возможность оценить потенциальную чувствительность предлагаемого метода регистрации.

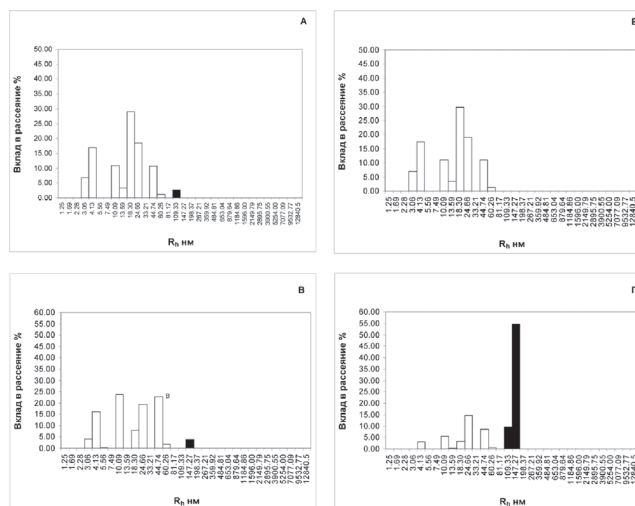


Рис. 1. Гистограммы распределения частиц по размерам исходной плазмы крови (А), плазмы крови, из которой иммуноглобулины были удалены путем сорбции на иммобилизованном белке А (Б), после добавления к такой плазме хитина (В), и исходной плазмы крови после добавление хитина (Г). По оси X – Гидродинамический радиус частиц в нм, по оси Y – Вклад в интенсивность светорассеяния в %.

Для оценки концентрационной чувствительности данного метода мы использовали модель, состоящую из эмбриональной телочной сыворотки, разбавленной в 10 раз физиологическим солевым раствором, pH 7,2. В раствор добавлялись мышинные моноклональные антитела, специфически связывающие церулоплазмин человека. Конечная концентрация антител составляла 0,005 мг/мл. Гибридная линия клеток, продуцирующих эти антитела, была получена в нашей лаборатории. Специфичность связывания антител, содержащихся в данной культуральной жидкости, с церулоплазмином была доказана ранее методом Western blot (данные не показаны). Перед тестированием образцы фильтровали через мембрану Omnipor JWVP (JWVP01300) с диаметром пор 0,1 мкм. Эта процедура позволяет исключить из исследуемого образца частицы с Rh более 100 нм.

В качестве антигена использовался стандартный церулоплазмин (содержащий медь гликозилированный белок с молекулярной массой 132 кДа), выделенный из плазмы крови человека. 1 мг церулоплазмина растворяли в 1 мл стандартного фосфатного буфера. Затем из полученного раствора путем разбавления фосфатным буфером готовили растворы церулоплазмина с концентраци-

Таблица 1. Концентрационная чувствительность описываемого метода по церулоплазмину

Концентрация ЦРП, мкг/мл	Вклад в рассеяние ИК, в %
1	48.1
0.2	26.9
0.04	13.4
0.008	6.9
0.00016	2.8
0.00008	Не регистрируется

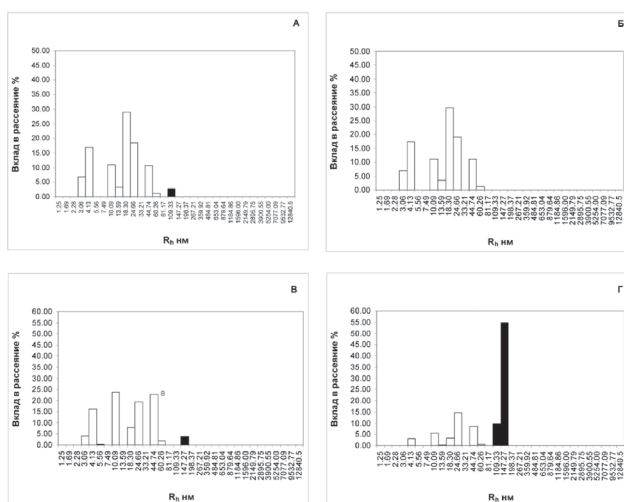


Рис. 2. Гистограммы распределения частиц по размерам в исходной эмбриональной телячьей сыворотке (А), после добавления к ней церулоплазмينا в концентрации 1000 нг/мл (Б), 160 пг/мл (В) и 80 пг/мл (Г). По осям то же, что и на рис. 1.

ями 5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 50 нг/мл, 10 нг/мл, 4 нг/мл, 1 нг/мл и 0.2 нг/мл. Образцы фильтровали через мембрану Millipore SWWP с диаметром пор 0,1 мкм и 20 мкл раствора церулоплазмينا добавляли к 180 мкл разбавленной эмбриональной телячьей сыворотки, содержащей моноклональные антитела против церулоплазмينا. Таким образом, конечная концентрация церулоплазмينا в образцах культуральной жидкости составляла 0,1 от исходной концентрации образца церулоплазмينا.

Измерения размеров частиц проводили на спектрометре динамического светорассеяния ЛКС-03 производства ООО «ИНТОКС-МЕД» по стандартному протоколу.

В исходных образцах сыворотки иммунные комплексы отсутствуют и регистрируются в основном частицы с Rh порядка 7 нм и 21 нм (рис. 2А). При добавлении к тестируемым образцам церулоплазмينا в конечной концентрации 1000 нг/мл (рис. 2Б) резко увеличивается вклад частиц с гидродинамическим радиусом порядка 100 нм (выделено черным цветом). Поскольку такие комплексы не образуются в образцах, которые не содержат антител, связывающих церулоплазмин, то резонно полагать, что они представляют собой иммунные комплексы, составленные молекулами церулоплазмينا, связанными между собой специфичными к нему молекулами антител. Уменьшение концентрации церулоплазмينا приводит к снижению доли вклада в рассеяние иммунных комплексов, что представлено в таблице 1 и рис. 2В, соответствующем концентрации 160 пг/мл.

При концентрации церулоплазмينا менее 80 пг/мл иммунные комплексы вообще перестают регистрироваться (рис. 2Д).

В ситуации, когда мы искусственно добавляем антигенный материал к плазме крови или иным биологическим жидкостям, возникновение крупных агрегатов, превышающих 100 нм, само по себе может быть однозначно интерпретировано как образование иммунных комплексов. Иное дело при обнаружении иммунных комплексов, предсуществующих в образцах биологических жидкостей. В плазме крови и других биологических жидкостях содержатся сотни и даже тысячи белков и их агрегатов. В этом случае обнаружение рассеивателей какого-либо размера

не может быть безусловно интерпретировано, как выявление иммунных комплексов. Необходима дополнительная информация, подтверждающая тот факт, что наблюдаемые агрегаты содержат иммуноглобулины.

Для доказательной идентификации пиков, соответствующих иммунным комплексам, на гистограммах динамического светорассеяния образцов плазмы крови мы применили подход, связанный с избирательным удалением иммуноглобулинов и их комплексов путем связывания с белком А, иммобилизованным на сефарозных частицах [15]. Хорошо известно, что белок А способен с высоким сродством связывать иммуноглобулины различных классов. При добавлении избыточного количества иммобилизованного белка А с последующим центрифугированием, можно с уверенностью считать, что подавляющая доля иммуноглобулиновых комплексов будет удалена из плазмы. Полученные нами гистограммы ДСР наглядно демонстрируют вклад иммунных комплексов в динамическое светорассеяние плазмы крови различных доноров.

Пример, представленный на рис. 3, демонстрирует вышеописанный подход. На рис. 3А присутствует пик со средним гидродинамическим радиусом (Rh) порядка 120 нм и вкладом в рассеяние порядка 75% (выделено черным). После добавления к данной плазме белка А, иммобилизованного на сефарозе, и последующего удаления этого аффинного сорбента центрифугированием, вклад в рассеяние таких частиц падает до 6% (рис. 3Б), то есть более чем на порядок. Таким образом, мы определенно можем утверждать, что пик на гистограмме соответствующий частицам с гидродинамическим радиусом Rh порядка 120 нм соответствует иммунным комплексам.

Другой прием идентификации пиков, соответствующих иммунным комплексам, на гистограмме исходной плазмы заключается в следующем: добавление в плазму моноклональных антител специфически связывающихся с иммуноглобулинами человека приведет к реакции агглютинации добавленных антител с иммуноглобулинами, входящими в состав иммунных комплексов, и как следствие иммунные комплексы будут дополнительно агрегировать друг с другом, что вызовет увеличение их размеров. Реализация данного подхода представлена на рис. 4. На рисунке приведена гистограмма плазмы крови. Пик, соответствующий иммунным комплексам, выделен черным цветом.

Как видно из приведенных данных средний Rh данных частиц увеличился почти в два раза со 120 нм (рис. 4А) до 220 нм (на рис. 4Б данный пик выделен крестообразной штриховкой).

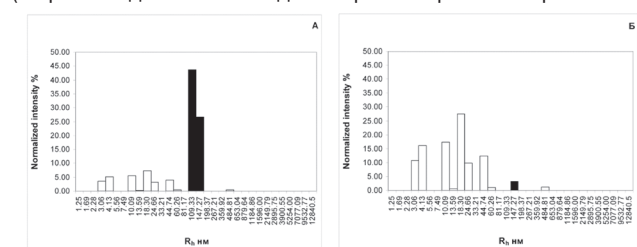


Рис. 3. Гистограммы распределения частиц по размерам исходной плазмы крови (А) и плазмы крови, из которой иммуноглобулины были удалены путем сорбции на иммобилизованном белке А (Б). По осям то же, что и на рис. 1.

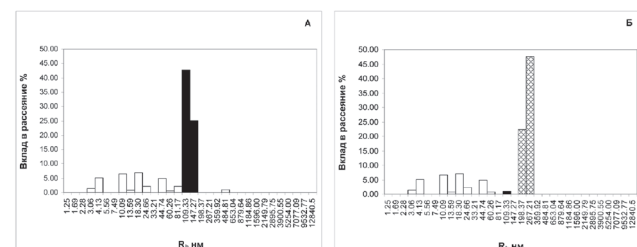


Рис. 4. Гистограммы распределения частиц по размерам исходной плазмы крови (А) и плазмы крови, после добавления антител к человеческим иммуноглобулинам (Б). По осям то же, что и на рис. 1.

И лишь небольшая часть (менее 1%) частиц осталась прежнего размера.

Предлагаемый метод позволяет также оценить минимальный уровень антител данной специфичности, который может быть выявлен по образованию светорассеивающих иммунных комплексов при добавлении соответствующего антигена. В таблице 2 представлены результаты измерений добавления специфических к церулоплазмину антител к эмбриональной телячьей сыворотке, содержащей 5 мкг/мл церулоплазмину.

Таблица 2. Концентрационная чувствительность описываемого метода по антителам, специфичным к церулоплазмину

Концентрация антител к церулоплазмину, в нанограммах	Вклад в рассеяние иммунных комплексов, в %
1	50,1
0,2	14,5
0,04	4,9
0,008	2,3
0,002	Не регистрируется

Появление иммунных комплексов измерялось с помощью динамического светорассеяния. Вклад таких комплексов в общее светорассеяние образцов, выражен в процентах.

Полученные результаты показывают, что метод позволяет регистрировать добавляемый белковый антиген вплоть до концентрации в несколько сотен пикограмм на мл и наличие специфических антител вплоть до концентрации менее 10 пикограмм/мл.

Обсуждение

Между тем существенное значение может иметь информация о динамике образования ИК, а также их распределение по размерам и составу. Для этих целей необходим метод исследования ИК, не связанный с их выделением и разложением на составляющие. Такой подход представляет не только общенаучный, но и большой практический интерес. Он мог бы быть использован в качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия в клинической практике, поскольку образование ИК сопровождает процессы возникновения и развития различных заболеваний.

Мы продемонстрировали, что метод динамического светорассеяния может быть успешно использован для исследования образования ИК в плазме крови и оценки их распределения по размерам от десятков до тысяч нанометров. Метод позволяет регистрировать ИК как предсуществующие в полученных образцах крови, так и образующиеся при добавлении экзогенных материалов. В последнем случае он может быть использован для тестирования присутствия антител, связывающихся с материалами или фармакопейными препаратами, используемыми в медицинской или ветеринарной практике. Это может быть полезно в стоматологии, трансплантологии и аллергологии.

Грубая оценка чувствительности метода, предпринятая нами в данной работе, показывает, что она сравнима с таковой иммуноферментных подходов, широко используемых для определения белков в плазме крови [16].

Впервые спектроскопия анизотропного светорассеяния была применена для решения сходных, но существенно более простых задач группой ученых под руководством Г.Б. Бенедика (Benedek GB) еще в 80-х годах прошлого века. Это количественный, точный и чувствительный метод анализа ранних стадий агрегации антигенов и антител в реакциях агглютинации [17–20].

С помощью динамического светорассеяния (измерение коэффициента диффузии частиц в растворе) можно достаточно точно определять количество свободных антигенов и антител в сильно разбавленных суспензиях, в том числе и в биологических жидкостях (сыворотке крови, моче).

В данной работе нами представлена относительно простая и чувствительная методика, позволяющая идентифицировать иммуноглобулины различных классов и изотипов в составе циркулирующих ИК без нарушения структурной целостности последних и при их минимальных концентрациях. Надеемся, что совершенствование этой методики будет способствовать лучшему по-

ниманию закономерностей образования иммунных комплексов и их вклада в различные функциональные и патологические состояния.

Выводы

Предлагаемая работа позволяет сделать вывод о том, что метод динамического светорассеяния позволяет исследовать иммунные комплексы в плазме крови и других гетерогенных биологических жидкостях без фракционирования последних на составляющие. Дальнейшее развитие метода может позволить получать информацию не только о наличии иммунных комплексов, но и о распределении нативных иммунных комплексов по размеру и содержанию составляющих их компонентов.

Литература:

1. Mibei EK, Orago AS, Stoute JA. Immune complex levels in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 593–9.
2. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J. IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA Nephropathy. *Semin Nephrol.* 2008; 28(1): 78–87.
3. 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. *Clin Chem.* 2011; 57(6): 905–9.
4. Odera M, Otieno W, Adhiambo C, Stoute JA. Dual role of erythrocyte complement receptor type 1 in immune complex-mediated macrophage stimulation: implications for the pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol.* 2011; 166(2): 201–7.
5. Senbagavalli P, Hilda JN, Ramanathan VD, Kumaraswami V, Nutman TB, and Subash Babu. Immune Complexes Isolated from Patients with Pulmonary Tuberculosis Modulate the Activation and Function of Normal Granulocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(12): 1965–71.
6. Papp K, Végh P, Hóbor R, Szittner Z, Vokó Z, Podani J, Czirájk L, Prechl J. Immune Complex Signatures of Patients with Active and Inactive SLE Revealed by Multiplex Protein Binding Analysis on Antigen Microarrays. *PLoS One.* 2012; 7(9): e44824.
7. Pastuskovas CV, Mallet W, Clark S, Kenrick M, Majidy M, Schweiger M, Van Hoy M, Tsai SP, Bennett G, Shen BQ, Ross S, Fielder P, Khawli L, Tibbitts J. Effect of immune complex formation on the distribution of a novel antibody to the ovarian tumor antigen CA125. *Drug Metab Dispos.* 2010; 38(12): 2309–19.
8. Senbagavalli P, Hilda JN, Ramanathan VD, Kumaraswami V, Nutman TB, and Subash Babu. Immune Complexes Isolated from Patients with Pulmonary Tuberculosis Modulate the Activation and Function of Normal Granulocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(12): 1965–71.
9. Ohyama K, Kuroda N. Immune complexome analysis. *Adv Clin Chem.* 2013; 60: 129–41.
10. Ohyama K, Kuroda N. Proteomic approaches to profiling the humoral immune response and identifying disease-associated antigens. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(9): 1409–12.
11. Lebedev AD, Ivanova MA, Lomakin AV, Noskin VA. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl Opt.* 1997; 36(30): 7518–22.
12. Landa SB, Filatov MV, Arutiunian AV, Varfolomeeva EV. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy. *Klin Lab Diagn.* 2008; (4): 37–41.
13. Брагинская ТГ, Клубин ВВ. Решение обратной задачи спектроскопии оптического смешения методом регуляризации Тихонова. *Препринт ЛИЯФ АН СССР*, 1983, Л., с. 42.
14. Trainer M. Methods and apparatus for determining particle characteristics by measuring scattered light. *US Patent 20100231909 A1*, 2010.
15. Kunkel S, Holtz M, Grossjohann B, Schuett W, Klinkmann H, Kong D, Yamada R, Kimura H, Matic GB, Ramlow W, Boeden HF. Selective removal of circulating immune complexes from patient plasma. *Artif Organs.* 2002; 26(2): 124–32.
16. McDade TW, Burhop J, Dohnal J. High-Sensitivity Enzyme Immunoassay for C-Reactive Protein in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry* 2004; 50(3): 652–4.
17. Cohen RJ, Benedek GB. Immunoassay by light scattering spectroscopy. *Immunochemistry* 1975; 12(4): 349–51.
18. Von Schulthess GK, Cohen RJ, Benedek GB. Laser light scattering spectroscopic immunoassay in the agglutination-inhibition mode for human chorionic gonadotropin (hCG) and human luteinizing hormone (hLH). *Immunochemistry* 1976; 13(12): 963–6.
19. Von Schulthess GK, Cohen RJ, Sakato N, Benedek GB. Laser light scattering spectroscopic immunoassay for mouse IgA. *Immunochemistry* 1976; 13(12): 955–62.
20. Von Schulthess GK, Giglio M, Cannell DS, Benedek GB. Detection of agglutination reactions using anisotropic light scattering: an immunoassay of high sensitivity. *Mol Immunol.* 1980; 17(1): 81–92.

References

- Mibel EK, Orago AS, Stoute JA. Immune complex levels in children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 593–9.
- Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J. IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA Nephropathy. *Semin Nephrol.* 2008; 28(1): 78–87.
- Ohyama K, Ueki Y, Kawakami A, Kishikawa N, Tamai M, Osaki M, Kamihiro S, Nakashima K, Kuroda N. Immune complexome analysis of serum and its application in screening for immune complex antigens in rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* 2011; 57(6): 905–9.
- Odera M, Otieno W, Adhiambo C, Stoute JA. Dual role of erythrocyte complement receptor type 1 in immune complex-mediated macrophage stimulation: implications for the pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol.* 2011; 166(2): 201–7.
- Senbagavalli P, Hilda JN, Ramanathan VD, Kumaraswami V, Nutman TB, and Subash Babu. Immune Complexes Isolated from Patients with Pulmonary Tuberculosis Modulate the Activation and Function of Normal Granulocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(12): 1965–71.
- Papp K, Végh P, Hóbor R, Sztittner Z, Vokó Z, Podani J, Czirájk L, Prechl J. Immune Complex Signatures of Patients with Active and Inactive SLE Revealed by Multiplex Protein Binding Analysis on Antigen Microarrays. *PLoS One.* 2012; 7(9): e44824.
- Pastuskovas CV, Mallet W, Clark S, Kenrick M, Majidy M, Schweiger M, Van Hoy M, Tsai SP, Bennett G, Shen BQ, Ross S, Fielder P, Khawli L, Tibbitts J. Effect of immune complex formation on the distribution of a novel antibody to the ovarian tumor antigen CA125. *Drug Metab Dispos.* 2010; 38(12): 2309–19.
- Senbagavalli P, Hilda JN, Ramanathan VD, Kumaraswami V, Nutman TB, and Subash Babu. Immune Complexes Isolated from Patients with Pulmonary Tuberculosis Modulate the Activation and Function of Normal Granulocytes. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(12): 1965–71.
- Ohyama K, Kuroda N. Immune complexome analysis. *Adv Clin Chem.* 2013; 60: 129–41.
- Ohyama K, Kuroda N. Proteomic approaches to profiling the humoral immune response and identifying disease-associated antigens. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(9): 1409–12.
- Lebedev AD, Ivanova MA, Lomakin AV, Noskin VA. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl Opt.* 1997; 36(30): 7518–22.
- Landa SB, Filatov MV, Arutiunian AV, Varfolomeeva EV. Study of plasma megamolecular complexation by laser correlation spectroscopy. *Klin Lab Diagn.* 2008; (4): 37–41.
- Braginskaya TG, Klyubin VV. Solution of the inverse problem of optical mixing spectroscopy by Tikhonov regularization. *Preprint LIYaF, 1983, L., p. 42 (in Russian).*
- Trainer M. Methods and apparatus for determining particle characteristics by measuring scattered light. *US Patent 20100231909 A1, 2010.*
- Kunkel S, Holtz M, Grossjohann B, Schuett W, Klinkmann H, Kong D, Yamada R, Kimura H, Matic GB, Ramlow W, Boeden HF. Selective removal of circulating immune complexes from patient plasma. *Artif Organs.* 2002; 26(2): 124–32.
- McDade TW, Burhop J, Dohnal J. High-Sensitivity Enzyme Immunoassay for C-Reactive Protein in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry* 2004; 50(3): 652–4.
- Cohen RJ, Benedek GB. Immunoassay by light scattering spectroscopy. *Immunochemistry* 1975; 12(4): 349–51.
- Von Schulthess GK, Cohen RJ, Benedek GB. Laser light scattering spectroscopic immunoassay in the agglutination-inhibition mode for human chorionic gonadotropin (hCG) and human luteinizing hormone (hLH). *Immunochemistry* 1976; 13(12): 963–6.
- Von Schulthess GK, Cohen RJ, Sakato N, Benedek GB. Laser light scattering spectroscopic immunoassay for mouse IgA. *Immunochemistry* 1976; 13(12): 955–62.
- Von Schulthess GK, Giglio M, Cannell DS, Benedek GB. Detection of agglutination reactions using anisotropic light scattering: an immunoassay of high sensitivity. *Mol Immunol.* 1980; 17(1): 81–92.

Authors:

State Research Institute Centre for Innovative Medicine, 9 Žygimantų Street, Vilnius, LT-01102, Lithuania.

Korabliov PV. PhD student at department of immunology.

B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute (NIC Kurchatov Institute), Orlova grove, Leningrad region, Gatchina, 188300, Russian Federation.

Landa SB. Senior researcher. Candidate of Biological Sciences.

Semenova EV. Researcher. Candidate of Biological Sciences.

Filatov MV. Head of Cell biology laboratory. Candidate of Biological Sciences.

Saint Petersburg State Polytechnic University, 29 Polytechnicheskaya Street, Saint Petersburg, 194064, Russian Federation.

Filatov MV. Docent of Biophysical department. Candidate of Biological Sciences.

Об авторах

Национальный научно-исследовательский институт «Центр инновационной медицины». Литва, LT-01102, Вильнюс, улица Жигиманту, 9.

Кораблёв Павел Валерьевич. Докторант отдела иммунологии.

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константина (НИЦ Курчатовский институт). Российская Федерация, 188300, Ленинградская область, Гатчина, Орлова роща.

Ланда Сергей Борисович. Старший научный сотрудник, канд. биол. наук.

Семенова Елена Вячеславовна. Научный сотрудник, канд. биол. наук.

Филатов Михаил Валентинович. Заведующий Лабораторией клеточной биологии, канд. биол. наук.

Санкт-Петербургский государственный политехнический университет. Российская Федерация, 194064, Санкт-Петербург, Политехническая улица, 29.

Филатов Михаил Валентинович. Доцент кафедры биофизики, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Филатов Михаил Валентинович; filatov@omrb.pnpi.spb.ru

Поступила 11.01.2015 г.
Принята 20.05.2015 г.